

G E N D O S I S W I R K U N G E N
in einem tri- und tetraploiden ad_2 -Mutantensystem
von *Saccharomyces*
und deren molekularbiologische Deutung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Uwe Reichert
aus Oppeln

1969
—

G E N D O S I S W I R K U N G E N
in einem tri- und tetraploiden ad_2 -Mutantensystem
von *Saccharomyces*
und deren molekularbiologische Deutung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Uwe Reichert

aus Oppeln



1. Referent: Professor Dr. W. LASKOWSKI

2. Referent: Professor Dr. H. LÜERS

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1968

Tag der Promotion:

17. FEB 1969

Die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Untersuchungen wurden am Institut für Biophysik [Direktor: Prof. Dr. W. Stein] der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski in der Zeit vom Sommersemester 1965 zum Sommersemester 1968 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Laskowski bin ich für Thema und Betreuung der Arbeit und zahlreiche wertvolle Diskussionen, Herrn Prof. Dr. W. Stein für vielfältig gewährte Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Den Herren I. Lamprecht und Dr. E.-R. Lochmann danke ich für anregende Diskussionen, Herrn G. Bjeske für seine Mithilfe beim Bau des Petrischalen-Photometers und meiner Frau Petra Reichert für die in ihrer Freizeit einsichtig und verantwortungsvoll ausgeübte technische Assistenz.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. <u>Einführung</u>	1
2. <u>Aufbau und Charakterisierung der verwendeten Stammsysteme</u>	3
2.1. Abriß über die bekannten Adenin-Loci von Saccharomyces. Der ad_2 -Locus.	3
2.2. Induktion, Isolierung und Charakterisierung von ad_2 -Mutanten. Isolierung und Charakterisierung einer Suppressor-Mutante.	9
2.3. Der Aufbau tri- und tetraploider Stammsysteme mit Hilfe von Genomverdopplungen, Kreuzungen und Tetradenanalysen.	19
2.4. Nomenklatur der Stämme	28
2.5. Übersicht über die verwendeten Stammsysteme	30
3. <u>Die Wachstumsgeschwindigkeit als phänotypischer Parameter.</u>	34
3.1. Beschreibung des Petrischalen-Photometers. Eichkurve.	37
3.2. Durchführung der Messungen	40
4. <u>Ergebnisse</u>	43
4.1. Ploidiegradabhängigkeit von Wachstumsgeschwindigkeit und Zellvolumen	43
4.2. Das $\square +o \square$ -System	46
4.3. Das $\square +t \square$ -System	49
4.4. Das $\square to \square$ -System	52
4.5. Das $\square ts \square$ -System	55
4.6. Ein Vergleich der Temperaturoptima der verwendeten [bis auf den Paarungstyp-Locus] homozygoten Stämme	57

4.7. Zusammenfassende Darstellung der Gendosiswirkungen in den verwendeten Stammsystemen	58
5. <u>Diskussion</u>	61
5.1. Kurzer Abriß über die heutigen Vorstellungen zur Proteinbiosynthese	61
5.2. Diskussion der Mutationsereignisse	67
5.3. Entwicklung und Diskussion eines quantitativen Modells zur Beschreibung der Gendosisabhängigkeit von Wachstumsgeschwindigkeiten - unter der Voraussetzung, daß das betrachtete Gen ein monomer aktives Enzym codiert.	69
5.4. Eine Erweiterung des Modells auf multimer aktive Enzyme	81
6. <u>Zusammenfassung</u>	87
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	90

1 . E I N F Ü H R U N G

Richard GOLDSCHMIDT widmet in seinem 1955 erschienenen, heute klassischen Buch "Theoretical Genetics" [deutsche Ausgabe 1961] ein umfangreiches Kapitel der "Kinetik der genischen Wirkung". In diesem Kapitel setzt er sich insbesondere mit einer Reihe der damals aus der *Drosophila*-Genetik bekanntgewordenen Untersuchungen zu der Frage, wie bestimmte Dosen einer genetischen Aberration die Ausprägung des entsprechenden Phänotyps beeinflussen, auseinander [z.B. Dosierung der Geschlechtschromosomen; Bar-Effekt (STURTEVANT 1925); Länge der Borsten in Abhängigkeit von der Zahl der bobbed-Allele (STERN 1929)].

Abgesehen davon, daß zu diesem Zeitpunkt der Mechanismus der genetischen Informationsübertragung noch weitgehend unverstanden war, scheiterte eine einleuchtende quantitative Interpretation auf molekularem Niveau an der Komplexität des Untersuchungsobjektes und damit an der Vielfalt der Deutungsmöglichkeiten.

Da *Drosophila* nur im diploiden Zustand wirklich stabil ist, beschränken sich Versuche mit einem größeren Spektrum an Gendosen auf die Analyse von Trisomien, Deletionen, Genverdopplungen oder -verdreifachungen und Kombinationen m e h r e r Allele des gleichen Gens. Die auf diesem Wege erzielbaren Ergebnisse sind entweder von vornherein quantitativ schwer zu erfassen oder von schlecht übersehbaren Randeffekten überlagert [z.B. "Positionseffekte" bei Gendeletionen, -duplikationen, -verdreifachungen].

Drosophila scheint somit für erste Orientierungsversuche zur Klärung der Grundprinzipien der Gendosisbeziehungen und damit der "Kinetik der genischen Wirkung" verhältnismäßig ungeeignet zu sein. Erst wenn diese Grundprinzipien an "einfacheren Systemen" erarbeitet worden sind, dürfte ein Verständnis derart komplexer Verhältnisse möglich sein.

Im folgenden sollen nun Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces*, die in optimaler Weise die Forderungen an ein für das skizzierte Problem "einfaches System" erfüllen dürfte, mitgeteilt werden.

Im Gegensatz zu *Drosophila* handelt es sich hierbei um einen einzelligen Organismus, der durch Verwendung von Mutationen zu bestimmten Nährstoffbedürftigkeiten (*Auxotrophien*) die Wirkungsweise von Genen relativ direkt zu beurteilen gestattet. Wie von einer Reihe von Autoren gezeigt werden konnte [LINDEGREN u. LINDEGREN 1951, LEUPOLD 1956, MORTIMER 1958, ROMAN et al. 1956], kommen bei *Saccharomyces stabilis* *Polyploonten* vor, und LASKOWSKI (1960, 1962) entwickelte Methoden, die aus einem Haplonten den Aufbau weitestgehend isogener und homozygoter Stämme bis zum Hexaplonten ermöglichen.

Damit sind die Voraussetzungen gegeben, ein größeres Spektrum an Gendosen nicht - wie oben - durch singuläre Vervielfachungen bzw. Deletionen einzelner Gene, Chromosomenabschnitte oder Chromosomen in einem sonst diploiden Organismus, sondern über die *Durchkombination zweier Allele* des gleichen Gens in einem *polyploiden Genom* zu erreichen. Mit diesem Verfahren können bei der diploiden *Drosophila* nur drei [AA, Aa, aa mit den Dosen 2/2 A, 1/2 A, 0/2 A], bei einer tetraploiden Hefe jedoch fünf Gendosen [AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa, aaaa mit 4/4 A, 3/4 A, 2/4 A, 1/4 A, 0/4 A] hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden nun als phänotypischer Parameter die Wachstumsgeschwindigkeiten tri- und tetraploider Stämme in Abhängigkeit verschiedener Dosierungen von Mutationen, die den *ad₂-Locus* von *Saccharomyces* direkt oder indirekt (Suppressor-Mutation) betreffen, bestimmt und diskutiert werden.

2. AUFBAU UND CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN STAMMSYSTEME

2.1. Abriß über die bekannten Adenin-Loci von *Saccharomyces*.

Der ad_2 -Locus.

Die 1966er Ausgabe des "Yeast Genetics Supplement to Microbial Genetics Bulletin" verzeichnet 13 über mindestens zwei Chromosomen [I, VII, Fragmente 1 und 2 (MORTIMER u. HAWTHORNE 1966)] verteilte Loci, die einzelne Reaktionsschritte in der Biosynthese des Adenins (s. Abb. 1a, 1b) über die von ihnen codierten Enzyme bei *Saccharomyces* steuern.

Für sechs der 13 Loci konnte gezeigt werden, daß deren Ausfall durch Mutation zur Anhäufung folgender Intermediärprodukte in der Zelle führt:

- ad_1 : AIR [5-Amino-imidazol-ribotid]^{1,2}
 ad_2 : CAIR [5-Amino-4-imidazol-carbonsäureribotid]²
 ad_{13} : SAICAR [5-Amino-4-imidazol-N-succinyl-carboxamidribotid]³
 ad_3 : AICAR [5-Amino-4-imidazol-carboxamidribotid]^{2,4}
 ad_4 : AICAR ["]²
 ad_{12} : Inosin³

Aus der Kenntnis des Akkumulationsproduktes läßt sich mit einiger Berechtigung folgern, daß dasjenige Enzym durch die Mutation betroffen ist, das die Umwandlung dieses Produktes in das folgende katalysiert. Voraussetzung einer vernünftigen Zuordnung ist allerdings,

1) FRIEDMAN u. MOAT 1958

2) LEVINTHAL et al. 1962

3) DORFMAN 1966 nach MAZLEN u. EATON 1967

4) MAZLEN u. EATON 1967

daß die Aufeinanderfolge der einzelnen Reaktionsschritte zumindest durch Untersuchungen an anderen Organismen gesichert ist.

Die Übereinstimmung der Anhäufungsprodukte von Adenin-auxotrophen *Saccharomyces*-Mutanten mit den Intermediärprodukten des Purinsyntheseweges in Taubenleber, *Neurospora* und Bakterien [s. z.B. LEVINTHAL et al. 1962] dürfte die Gültigkeit der in den Abb. 1a und 1b dargestellten Reaktionskette für *Saccharomyces* bestätigen.

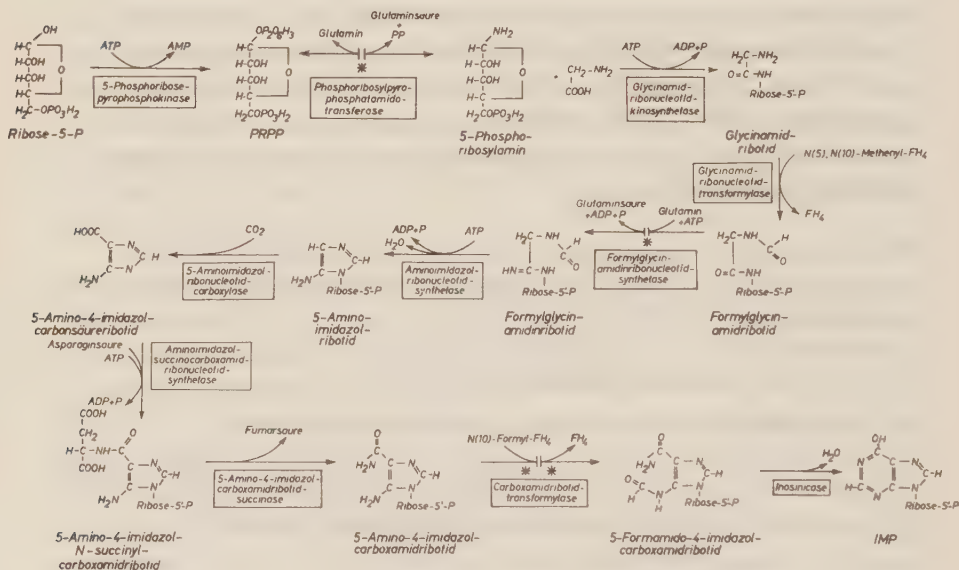


Abb. 1a : Allgemeines Schema der Purin-Biosynthese vom Ribose-5'-phosphat bis zum Inosin-5'-monophosphat [aus HARBERS 1964].

Somit erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß in den CAIR-akkumulierenden ad_2 -Mutanten, die mit $ad-3B$ von *Neurospora crassa* und ad_6 von *Schizosaccharomyces pombe* zu vergleichen sind [cf. INGE-VECHTOMOV et al. 1966], die Amino-imidazol-succino-carboxamid-

ribonucleotid-Synthetase betroffen ist, daß also der ad_2 -Locus von *Saccharomyces* die genetische Information für die Aminosäuresequenz der SAICAR-Synthetase enthält.

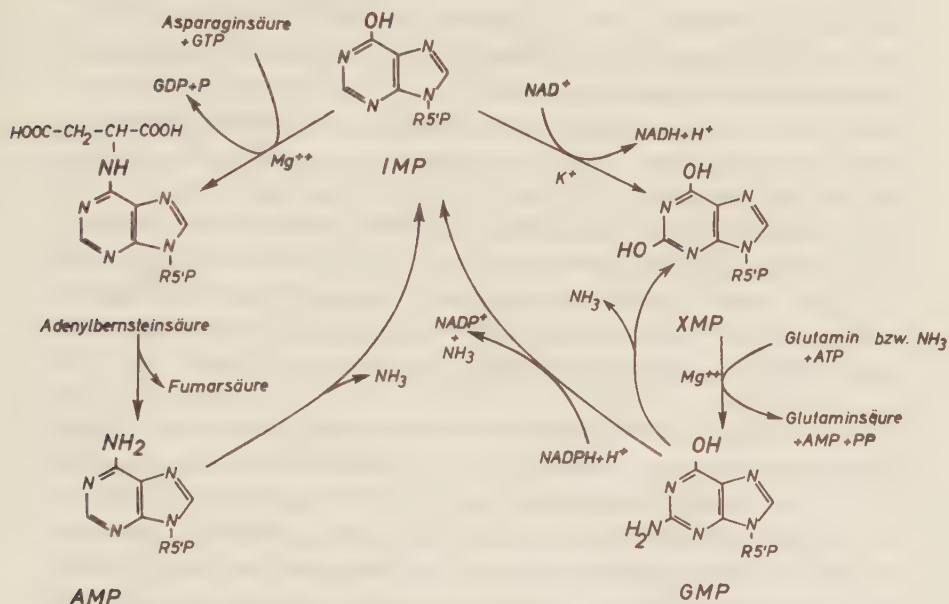


Abb. 1b : Allgemeines Schema der Purin-Biosynthese vom Inosin-5'-monophosphat zum Adenosin- (bzw. Guanosin-) 5'-monophosphat [aus HARBERS 1964].

Nach LOCHMANN (pers. Mitt.) ist bei *Saccharomyces* in vivo zwar die Umwandlung von Adenin in Guanin, jedoch nicht von Guanin in Adenin möglich. Daraus erklärt sich, daß sich die bisher gefundenen, den Purin-Syntheseweg blockierenden *Saccharomyces*-Mutanten in Adenin-, nicht jedoch in Guanin-Auxotrophien äußern.

Neben den AIR-anhäufenden ad_1 -Mutanten [ad_3A bei *Neurospora*, ad_7 bei *Schizosaccharomyces*, s.o.] zeichnen sich nun die ad_2 -Mutanten dadurch aus, daß sie unter bestimmten Kulturbedingungen ⁵ rote Koloniefärbung aufweisen.

EPHRUSSI u. LEDERER (1948) isolierten aus Adenin-bedürftigen *Saccharomyces*-Zellen den roten Farbstoff und beobachteten, daß durch Säurehydrolyse Aminosäuren freigesetzt wurden, so daß die Vermutung eines mit dem Pigment assoziierten Peptids nahelag. Ferner konnte gezeigt werden, daß der Farbstoff auftritt, wenn das Wachstum der Zellen stagniert [TAVALITZKI 1951], und daß zu dessen Bildung Sauerstoff [TAVALITZKI 1951] und Methionin [CUTTS u. RAINBOW 1950] im Kulturmedium benötigt werden. ITOH u. NOSOH (1965) fanden, daß auch unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart überschüssigen Methionins ein "pigment precursor" entsteht, der bei Belüftung mit Sauerstoff in das eigentliche Pigment umgewandelt wird.

Während aus den bisher zitierten Arbeiten kein eindeutiger Hinweis auf den untersuchten Adenin-Locus zu ziehen ist, analysierten SMIRNOV et al. (1967) das von einer ad_1 -Mutante [6-7/3, SMIRNOV et al. 1966] synthetisierte Pigment. Sie geben eine Reihe von Fakten an, die dafür sprechen, daß es sich zumindest zum Teil um ein Polyribosylaminoimidazol handelt, das durch oxydative Kondensation von AIR entsteht und zu einem linearen Polymer mit einem charakteristischen System konjugierter Bindungen führt, die für die Lage der Absorptionsmaxima bei 490 und 540 nm verantwortlich sind. Die chemische Analyse zeigt, daß die Polykondensation nicht von einer Desaminierung der aromatischen NH_2 -Gruppen begleitet ist, andererseits weist die relativ geringe Fähigkeit zur Diazotierung darauf hin, daß die meisten der aromatischen NH_2 -Gruppen substituiert sind.

-
- 5) Bebrütung bei 30° C auf festem "Testmedium" [2 % Agar (DIFCO), 2 % Glucose, 0,5 % Yeast-Extract (DIFCO), entmineralisiertes Wasser (APURA-Ionen-Mischbettaustauscher). Das Medium wurde 15 min bei 120° C autoklaviert.

Da Behandlung mit Pronase nicht zu einer signifikanten Änderung im Molekulargewicht führt, kann geschlossen werden, daß die Aminosäuren nicht an der Bildung des Polymergerüsts teilhaben, sondern eher über Amidbindungen mit den Aminogruppen der Imidazolringe an das Poly-AIR gebunden sind.

Um wenigstens einen ersten Hinweis dafür zu erhalten, ob der infolge einer Mutation des ad_2 - Locus gebildete Farbstoff mit dem von SMIRNOV et al. untersuchten zu vergleichen ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Der diploide, homozygot Adenin-prototrophe Wildtypstamm 1100 und der bei Temperaturen über 30°C Adenin-auxotrophe, im ad_2 -Locus homozygot mutierte Stamm A 1120 wurden für 3 Tage in jeweils 250 ml flüssigem "Testmedium" (ohne Agar) bei 32°C bebrütet. Danach wurden die beiden Proben abzentrifugiert, zweimal in $m/20\text{ KH}_2\text{PO}_4$ "gewaschen"⁶, mit jeweils 20 ml $m/20\text{ KH}_2\text{PO}_4$ aufgenommen, 1 min unter Kühlung mit Kohlendäureschnee mit Hilfe von Glasperlen in einem BRAUN-Homogenisator mechanisch desintegriert, 10 min bei 3000 g, 30 min bei 30 000 g und anschließend 60 min bei 100 000 g abzentrifugiert. Nach Verdünnung der Überstände mit $m/20\text{ KH}_2\text{PO}_4$ (1:10) wurde das Spektrum der beiden Proben in einem BECKMAN-Spektralphotometer aufgenommen.

Wie aus der Abb. 2 hervorgeht, zeigt das Spektrum des Wildtypextraktes einen homogenen Verlauf, während der Extrakt aus der ad_2 -Mutante zwei ineinander übergehende Absorptionsmaxima bei 485 und 530 nm aufweist. Durch Kochen des Extraktes wurde das Maximum bei 530 nm ab- und das bei 485 nm unter Verschiebung nach 475 nm aufgebaut. Ein zwölfstündiges Einwirken von Pronase (5 mg auf 4 ml einer Probe) bei 30°C hatte bezüglich des unbehandelten Mutanten-Extraktes keinen Einfluß.

-
- 6) Der "Wasch"vorgang besteht in einer wiederholten Zentrifugation und Neususpendierung der Zellen in frischem $m/20\text{ KH}_2\text{PO}_4$.

Ein Vergleich des roten Farbstoffes von A 1120 mit den von SMIRNOV et al. (1967) und ITOH u. NOSOH (1965; s. dort) untersuchten Pigmenten weist auf große Ähnlichkeiten im Absorptionsverhalten hin. Es ist daher zu vermuten, daß ein Ausfall des ad_2 -Genproduktes entweder zur (oxydativen) Polykondensation des akkumulierten CAIR führt, oder aber, daß (in Verbindung mit einer Decarboxylierung des CAIR) wie bei der ad_1 -Mutante SMIRNOVs ein Poly-AIR entsteht.

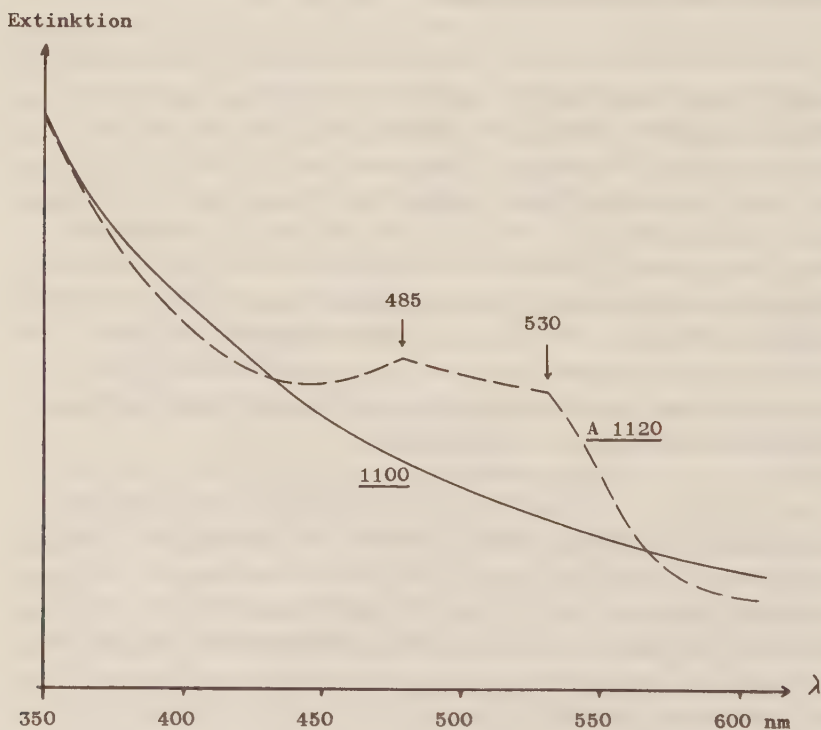


Abb. 2 : Absorptionsspektrum des Rohextraktes eines Adenin-prototrophen [1100] und eines bei Temperaturen über 30° C Adenin-auxotrophen [A 1120] Saccharomyces-Diplonten.

Diese Fähigkeit zur Bildung roter Kolonien bietet für Kreuzungen, Tetradenanalysen und für die Kontrolle der Stämme große methodische Erleichterungen, da homoallelische und nicht komplementierende heteroallelische ad_2 -Mutanten phänotypisch sofort zu erkennen sind.

Aus diesem Grund wurden für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen Mutationen, die den ad_2 -Locus betreffen, ausgewählt.

2.2. Induktion, Isolierung und Charakterisierung von ad_2 -Mutanten.

Isolierung und Charakterisierung einer Suppressor-Mutante.

Als Ausgangsmaterial zum Aufbau der benötigten tri- und tetraploiden Stämme diente der prototrophe, in flüssigem Nährmedium zur Klumpenbildung neigende Haplont 211-1b mit dem Paarungstyp a aus LASKOWSKI's Stammsammlung (LASKOWSKI 1960). Durch spontane PT^7 -Mutation [$a \rightarrow \alpha$] und Kopulation der a- und α -Haplonten entstanden PT-heterozygote Diplonten, aus denen SCHÄDEL den Stamm 211-1bS [$a\alpha$] isolierte. Sporulation und Tetradenanalyse [Einzelheiten s. Kapitel 2.3.] dieses Diplonten lieferten vier bis auf den PT-Locus weitestgehend identische Haplonten [2 a und 2 α], von denen je ein a- [im folgenden als Stamm 1000 bezeichnet; zur Nomenklatur der Stämme s. Kapitel 2.4.] und ein α -Haplont [Stamm 100] weiterverwendet wurden.

Zur Induktion von Mutationen zur Adenin-Auxotrophie wurde 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-Guanidin [MNNG] benutzt, dessen stark mutagene Wirkung von SÜSSMUTH u. LINGENS (1968) neben der Desaminierung des Adenins vor allem der Methylierung der DNS-Basen [insbesondere des Guanins (CHANDRA et al. 1967)] zugeschrieben wird.

7) Das Wort "Paarungstyp" wird in dieser Arbeit häufig mit "PT" abgekürzt.

Da es bei den vorliegenden Untersuchungen nur darauf ankam, überhaupt ad_2 -Mutanten zu erhalten, wurde auf die Erarbeitung optimaler Induktionsbedingungen für *Saccharomyces* [die inzwischen vorliegen (s. z.B. die Beiträge von LINGENS u. OLTMANNS 1966, SÜSSMUTH u. LINGENS 1968)] verzichtet und den von ADELBERG et al. 1965 für *Escherichia coli* veröffentlichten Anweisungen im großen und ganzen gefolgt.

Um ferner eine möglichst gute Ausbeute an Mutanten zu erzielen, wurde im Prinzip die von MEGNET (1965) angewandte Methode zur Anreicherung auxotropher Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* über die sich im wesentlichen in exponentiell wachsenden Zellen ausprägende fungizide Wirkung der 2-Desoxy-D-Glucose [DG] ohne Prüfung ihrer Wirksamkeit bei *Saccharomyces* übernommen.

Ein derartiges Verfahren, das die Erfolgchancen zumindest nicht mindert, schien in diesem Falle gerechtfertigt zu sein (s.o.).

In der folgenden Aufstellung sei in übersichtlicher Form der Versuchsplan zur Induktion und Isolierung "roter" Adenin-Mutanten dargestellt. In der linken Spalte sind die zwischen den einzelnen Arbeitsschritten liegenden Zeitintervalle Δt [in Stunden] angeführt.

Δt	Arbeitsschritt
0	<u>Vorpassage</u> : Abimpfen einer Probe des haploiden prototrophen Stammes 1000 vom Schrägagar ⁸ mit Hilfe einer über dem Bunsenbrenner ausgeglühten Impfpöse. Inkubation in ein mit 5 ml

-
- 8) Die isolierten und gereinigten Stämme werden in einem verschraubbaren Glasröhrchen auf schräg gegossenem festem Vollmedium [s. Fußnote 9), S. 11] im Kühlschrank bei ca. 4° C aufbewahrt.

flüssigem Vollmedium⁹ gefülltes Reagenzglas. Bebrütung für 16 Stunden¹⁰.

- 16 Hauptpassage: Überpipettieren von 1 ml der Vorpassage in 5 ml flüssiges Vollmedium. 4 Stunden Bebrütung.

- 4 [Die Zellen befinden sich jetzt am Anfang der logarithmischen Wachstumsphase (s. Kapitel 3) und sind besonders empfindlich für die Einwirkung von Mutagenen.]

Abzentrifugieren der Hauptpassage, 2mal "waschen", mit 5 ml m/20 KH_2PO_4 aufnehmen, 30 sec mit Ultraschall¹¹ zur Aufspaltung der Zellklumpen behandeln.

Abtrennung der noch verbleibenden Zellklumpen durch fraktionierte Zentrifugation [1 min bei 100 g], nochmalige Behandlung des Überstandes mit 30 sec Ultraschall, anschließend 2 ml der Probe mit 4 ml MNNG-Lösung [30 mg MNNG / 10 ml m/20 KH_2PO_4] für 30 min bei 30° C inkubieren.

-
- 9) 2 % Glucose, 1 % Yeast-Extract (DIFCO), entmineralisiertes Wasser. 15 min bei 120° C autoklavieren. Festes Vollmedium enthält zusätzlich 2 % Agar (DIFCO).
- 10) Die Bebrütung erfolgte in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen - wenn nicht anders angegeben - bei 30° C. Flüssige Kulturen wurden dabei zur besseren Durchlüftung geschüttelt.
- 11) Die Ultraschallbehandlung wurde nach der von JANNSEN u. LAS-KOWSKI (1967) beschriebenen Methode mit Hilfe eines BRANSON-Ultraschall-Desintegrators (Sonifer S 75) [Intensitätsstellung 4, Resonanz 3,6 - 3,8 A] vorgenommen. Nach den genannten Autoren werden bei einminütiger Beschallung unter diesen Bedingungen praktisch alle Zellklumpen des Stammes 211-1b in Einzelzellen zerteilt, während eine Schädigung der Stoffwechselprozesse weitgehend unterbleibt.

- 0,5 Abzentrifugieren der Zellen, 2mal "waschen", mit 4 ml
m/20 KH_2PO_4 aufnehmen,
30 sec Ultraschall,
fraktionierte Zentrifugation [1 min bei 100 g],
Überstand abnehmen, abzentrifugieren, mit 5 ml flüssigem
Vollmedium aufnehmen und für 2 Stunden bebrüten.
- 2 Zellen abzentrifugieren, 2mal "waschen", mit 4,5 ml Citrat-
Minimalmedium¹² aufnehmen, für 2 Stunden bebrüten.
- 2 Probe mit 0,5 ml einer DG-Lösung [60 mg DG / 10 ml Citrat-
Minimalmedium] versetzen, ca. 60 Stunden bebrüten.
- 60 Je 0,1 ml auf mit festem "Testmedium" [s. Fußnote 5, S. 6]
versehenen Petrischalen ausplatten und mehrere Tage bebrüten.

In zwei Versuchen dieser Art konnten elf rote Kolonien isoliert werden, von denen fünf mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine einzelne mutierte Ausgangszelle zurückgehen [A 1010, B 1010, C 1010, D 1010, E 1010]. Von diesen fünf Stämmen wurde A 1010 näher analysiert.

Zwei Stämme [X 1010, Y 1010] erwiesen sich als instabil [hohe "Rückmutations"rate] und wurden verworfen.

Für zwei [A 1010, F 1010] der verbleibenden fünf Stämme [A 1010, F 1010, G 1010, H 1010, I 1010] konnte durch Kreuzung nachgewiesen werden, daß sie

1. nicht miteinander und
2. nicht mit einem ad_2 -Teststamm aus LASKOWSKI's Stammsammlung komplementieren. Durch paralleles Ausplatten auf synthetisches Mini-

12) 670 mg Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (DIFCO) + 192 mg Citronensäure auf 100 ml entmineralisiertes Wasser.
Das Medium wurde für 15 min bei 115°C autoklaviert.

malmedium ohne¹³ und mit¹⁴ Adeninzusatz wurde ihre ausschließliche Adenin-Auxotrophie sichergestellt.

Bei diesen Testuntersuchungen zeigte es sich, daß der Stamm A 1010 zwar nicht bei Temperaturen über 30° C, wohl aber bei Temperaturen um 25° C und darunter auf Adenin-freiem Minimalmedium wächst, während F 1010 in dem geprüften Temperaturbereich von 20° bis 40° C nicht vermehrungsfähig ist.

Aus dem Ergebnis des Komplementierungstests gegen LASKOWSKIs ad₂-Stamm folgt, daß in beiden Stämmen der ad₂-Locus mutiert ist, aus dem unterschiedlichen Temperaturverhalten, daß zwei verschiedene Allele des ad₂-Gens betroffen sind. Diese beiden Allele seien als ad₂₋₁^t [A 1010] und ad₂₋₂^o [F 1010] bezeichnet, wobei die hochgestellten Buchstaben spezifische Alleleigenschaften angeben [t = temperaturabhängig, o = temperaturunabhängig Adenin-bedürftig], während die fortlaufende Numerierung im Index unabhängig aufgetretene Mutationen charakterisiert.

Bisher stehen somit folgende Allele des ad₂-Locus in sonst isogenen Stämmen zur Verfügung:

Tabelle 1

Allel	Stamm	Charakterisierung
ad ₂ ⁺	1000 100	Wildtyp, Adenin-prototroph, bildet auf "Testmedium" bei allen Temperaturen weiße Kolonien.
ad ₂₋₁ ^t	A 1010	Temperaturabhängig Adenin-auxotroph, bildet auf "Testmedium" bei 25° weiße, bei 35° C rote Kolonien.
ad ₂₋₂ ^o	F 1010	Temperaturunabhängig Adenin-auxotroph, bildet auf "Testmedium" im geprüften Temperaturbereich [20° - 40° C] nur rote Kolonien.

Da beim Arbeiten mit den beiden Adenin-auxotrophen Stämmen immer wieder einzelne weiße Klone unter den roten Kolonien zu finden waren, lag es nahe, diese s p o n t a n e n " R e v e r t a n t e n " auf S u p p r e s s o r - Eigenschaften zu überprüfen, um somit einen zusätzlichen Parameter für die Analyse von Gendosis-abhängigkeiten zur Verfügung zu haben.

Im Gegensatz zu den eigentlichen Rückmutationen zeichnen sich echte Suppressor-Mutationen dadurch aus, daß der Effekt einer Primärmutation durch eine weitere (Sekundär-)Mutation an einer anderen Stelle des Genoms auf dem Niveau der Translation kompensiert wird [s. z.B. die zusammenfassende Darstellung von GORINI u. BECKWITH 1966. Eine ausführliche Erörterung dieses Problemkreises erfolgt im Kapitel 5.1.]. Wird daher ein supprimierter Haplont mit einem Wildtyp-Haplonten gekreuzt, so sollte bei Tetradenanalysen die Primärmutation (mit der Wahrscheinlichkeit von 25 % bei ungekoppelten Genen) herausspalten.

In einer Reihe von Versuchen wurden Proben der Stämme A 1010 und F 1010 zunächst in flüssigem Vollmedium angezüchtet und anschließend bei 30° C für mehrere Tage in flüssigem Minimalmedium inkubiert. Von den Ansätzen, die im Minimalmedium Wachstum zeigten, wurden nach Bestimmung des Zelltiters [durch mikroskopisches Auszählen in einer BÜRKER-TÜRK-Hämatocytometer-Kammer] und entsprechender Verdünnung jeweils etwa 500 Zellen auf festes Minimalmedium (Petrischalen) ausgespatelt und für etwa eine Woche bei 35° C bebrütet. Von jedem Ansatz wurde dann jeweils eine Kolonie abgeimpft und durch Kreuzung gegen den Wildtypstamm 100 geprüft, ob die Adenin-Auxotrophie in den Tetraden wieder herausspaltet, ob also das prototrophe Verhalten der isolierten Kolonien auf eine Suppressor-Mutation zurückgeführt werden kann.

-
- 13) 2 % Agar (DIFCO), 3 % Glucose, 2 % Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (DIFCO), entmineralisiertes Wasser. Das Medium wurde 15 min bei 115° C autoklaviert.
- 14) wie 13). Zusätzlich 6 mg-% Adenin.

Von 25 [20 A 1010, 5 F 1010] getesteten Revertanten erwies sich nur eine als ungekoppelte, echte Suppressor-Mutante, die im folgenden die Stammbezeichnung A 1011 A/1 trägt und die vom Wildtyp abweichenden Allele ad_{2-1}^t und $su_1^+ - ad_{2-1}^t$ [abgekürzt s^+ oder s , das entsprechende Wildtypallel $su_1^- - ad_{2-1}^t$ wird in vereinfachter Schreibweise mit s^- oder - wiedergegeben] enthält. Eine nähere Analyse zeigte, daß $su_1^+ - ad_{2-1}^t$ zwar in beschränktem Maße den Effekt der ad_{2-1}^t -, nicht jedoch der ad_{2-2}^0 -Mutation zu kompensieren vermag.

A 1011 A/1 zeichnete sich dadurch aus, daß seine Zellen in überwiegender Zahl nicht die kugelig bis leicht ellipsoide Form normaler haploider Zellen [vergl. z.B. die Abbildung von 211-1a in LASKOWSKI 1960] hatten, sondern stark verlängert waren [s. Abb. 3].



Abb. 3 : Zellformen des haploiden Stammes A 1011 A/1.

Nach Kreuzung mit dem Wildtypstamm 100 und anschließender Sporulation wiesen die Zellen des aus den Tetraden isolierten Stammes A 1011 A/1b gleichen Genotyps jedoch - trotz Erhaltung der Suppressor-Eigenschaft - die übliche Gestalt haploider Hefezellen auf, so daß die vorherige Aberranz der Zellform mit einiger Wahrscheinlichkeit auf einen plasmatischen Defekt zurückgeführt wer-

den kann [vergl. z.B. das analoge Verhalten vegetativer "petite"-Mutanten (zusammenfassende Darstellung bei ESSER u. KUENEN 1965)]. Eine polygene Mutation darf in diesem Fall mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da aus über 200 untersuchten Sporen [es wurden allein 40 vollständige Tetraden geprüft] keine Klone mit einem über das übliche Maß hinausgehenden Anteil aberranter Zellen hervorgingen.

Aus der obigen Kreuzung konnten ferner neben Adenin-auxotrophen Haplonten vom Genotyp $ad_{2-1}^+ s^-$ Haplonten der Konfiguration $ad_2^+ s^+$ gewonnen werden, die zwar isoliert, nicht jedoch zum Aufbau höherploider Stämme herangezogen wurden.

Wie aus der Tabelle 2 (S. 17), in der in übersichtlicher Weise die Kriterien zusammengetragen sind, die eine phänotypische Differenzierung zwischen verschiedenen haploiden Allelkombinationen gestatten, zu ersehen ist, scheinen sich die $[ad_2^+ s^+]$ -Haplonten von den Wildtyp-Haplonten $[ad_2^+ s^-]$ durch längere Generationszeiten zu unterscheiden. Da es sich bei den angegebenen Daten jedoch um Mittelwerte aus nur drei Messungen handelt, ist dieses Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten. Auf eine statistische Absicherung wurde verzichtet, da eine eindeutige Entscheidung aufgrund genetischer (Tetraden-) Analysen möglich ist.

Diesen Abschnitt abschließend, sei in Abb. 4 (S. 18) noch einmal schematisch die Entstehung der bisher besprochenen haploiden Stämme, die später zum Aufbau tri- und tetraploider Systeme benötigt werden, zusammengestellt.

Tabelle 2

Allelkombination ¹⁵	Wachstum auf festem Minimalmedium bei		Farbe der Kolonien auf festem "Testmedium" bei		Mittlere Generationszeit in flüssigem "Testmedium" bei 30° C ¹⁶
	25° C	35° C	25° C	35° C	
+ s ⁻	+	+	weiß	weiß	1,45 h
+ s ⁺	+	+	weiß	weiß	1,68 h
t s ⁻	+	-	weiß	rot	1,85 h
t s ⁺	+	+	weiß	rot	1,74 h
o s ⁻	-	-	rot	rot	nicht gemessen
o s ⁺	-	-	rot	rot	nicht gemessen

15) Die Symbole stehen für folgende Allele:

$$+ = ad_2^+ (\text{Wildtyp})$$

$$t = ad_{2-1}^t$$

$$o = ad_{2-2}^o$$

$$s^- = su_1^- ad_{2-1}^t (\text{Wildtyp})$$

$$s^+ = su_1^+ ad_{2-1}^t$$

16) Die Generationszeiten wurden über die Aufnahme von Wachstumskurven mit Hilfe eines LANGE-Kolorimeters (s. Abschnitt 3.) bestimmt. Die angegebenen Werte resultieren aus der Messung von drei Ansätzen.

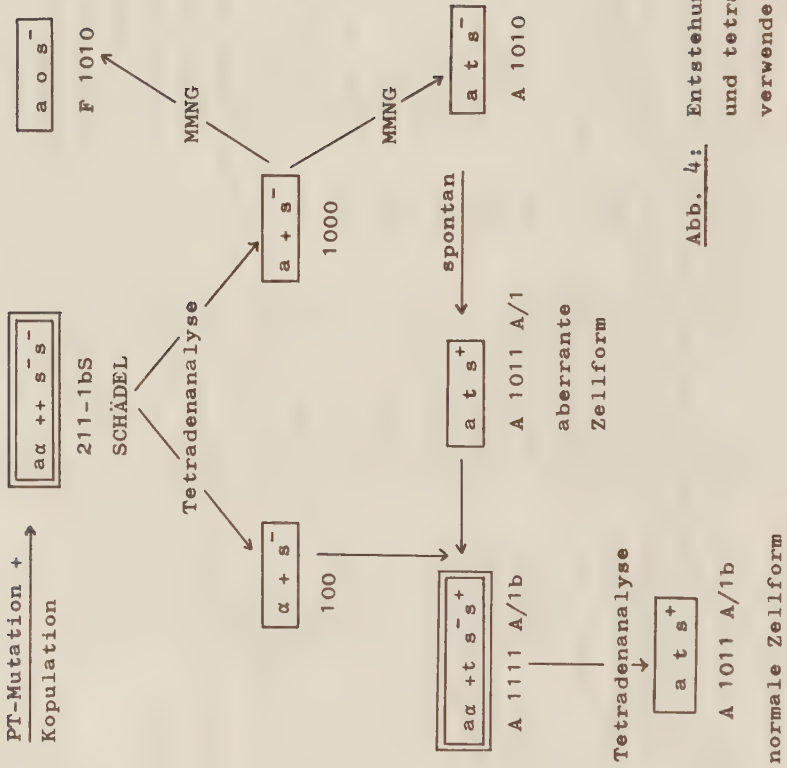


Abb. 4: Entstehung der zum Aufbau tri- und tetraploider Stammsysteme verwendeten Haplonten aus 211-1b.

2.3. Der Aufbau tri- und tetraploider Stammsysteme mit Hilfe von Genomverdopplungen, Kreuzungen und Tetradenanalysen.

Da ausschließlich Stämme entgegengesetzten Paarungstyps miteinander kopulieren [ein allgemein-zusammenfassender Überblick über Entwicklungszyklen und Erbverhalten der Hefen findet sich bei LASKOWSKI 1960*], ließe sich mit dem bisher besprochenen haploiden Stamm-Material (Abb. 4), das bis auf den Wildtypstamm 100 aus α -Haplonten besteht, nur eine beschränkte Auswahl an heterozygoten, nicht kopulationsfähigen Diplonten herstellen. Zum Aufbau höherploider Stämme müssen daher neben den fehlenden α -Haplonten PT-homozygote Diplonten gewonnen werden.

Nun treten in haploiden *Saccharomyces*-Kulturen neben PT-Mutationen - die durch Kopulation der PT-mutierten Zelle mit einer Ausgangszelle PT-heterozygote, ansonsten isogene und homozygote Diplonten liefern - mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch **G e n o m - v e r d o p p l u n g e n o h n e a n s c h l i e ß e n d e M i t o s e** auf, so daß ein in allen Loci - einschließlich des PT-Locus - homozygoter Diplont entsteht [s. z.B. ROMAN u. SANDS 1953].

Von den Haplonten unterscheiden sich diese homozygoten Diplonten durch folgende Kriterien [cf. LASKOWSKI 1960]:

- a) annähernd doppelt so großes Zellvolumen (s. auch Kapitel 4.1.),
- b) höhere Wachstumsgeschwindigkeit (s. auch Kapitel 4.1.),
- c) bedeutend geringere Empfindlichkeit gegen UV- und Röntgenstrahlen.

In noch stärkerem Maße gelten diese Merkmale, die eine Isolierung und erste Charakterisierung diploider Zellen aus haploiden Kulturen ermöglichen, für PT-heterozygote Diplonten, die jedoch nicht kopulieren (s.o.), dagegen aber sporulieren können.

Unter Ausnutzung des Kriteriums b) wurden die haploiden Kulturen zur Anreicherung spontan entstandener Diplonten täglich in frisches flüssiges Vollmedium überimpft und bei 30° C unter Schüt-

teln bebrütet. Entnommene Proben wurden auf das Auftreten größerer (Kriterium a), weniger stark klumpender Zellen hin unter dem Mikroskop durchgesehen. Bei genügender Anhäufung wurden einzelne derartige Zellen mit Hilfe eines pneumatischen FONBRUNE-Mikromanipulators auf festes Vollmedium gebracht, bebrütet und die aufgewachsenen Kolonien sowohl zur Aufbewahrung auf Schrägagar gelegt als auch erneut in flüssigem Vollmedium angezüchtet. Durch nochmalige mikroskopische Inspektion wurde geprüft, ob sich der isolierte Stamm in seiner Zellgröße deutlich von seinem Ausgangsstamm unterschied, und durch Kreuzungs- und Sporulationsversuche sichergestellt, daß es sich nicht um $\alpha\alpha$ -Diplonten handelte.

Der durch das relativ größere Zellvolumen und die Fähigkeit zur Kopulation gestützte Verdacht auf PT-homozygote Diplonten wurde in einigen Fällen durch vergleichende Röntgen-Dosiseffektkurven (Kriterium c) untermauert. Eine eindeutige Entscheidung war jedoch erst durch Kreuzung mit einem Haplonten komplementären Paarungstyps und anschließende Tetradenanalyse möglich (s.u.).

Die Kreuzungen wurden gewöhnlich auf festem Nähragar vorgenommen.

Hierzu wurden die Elternstämme zunächst getrennt auf festes Vollmedium ausgestrichen, 12 Stunden bebrütet und anschließend mit Hilfe eines auf einen Metallzylinder gespannten, sterilen Samttuches auf frisches Vollmedium übereinander gestempelt. Nach 3-4 Stunden Bebrütung wurden die ersten Tochterzellen eindeutiger Zygoten mikromanipulatorisch abgetrennt, angezüchtet und auf Schrägagar gelegt.

Zur Sporulation wurden die erhaltenen PT-heterozygoten Stämme 12 Stunden auf festem Präsporulations-Medium¹⁷ inku-

17) 2 % Agar, 2 % Glucose, 0,2 % Ammoniumsulfat, 0,2 % KH_2PO_4 , 0,5 % Yeast-Extract (DIFCO), entmineralisiertes Wasser. Das Medium [Zusammensetzung nach McCLARY et al. 1959] wurde 15 min bei 120° C autoklaviert.

biert, danach mit 5 ml m/20 KH_2PO_4 abgespült, abzentrifugiert, 2mal "gewaschen", mit 10 ml flüssigem Sporulationsmedium¹⁸ aufgenommen, in einen 100 ml-ERLENMEYER-Kolben gebracht und etwa eine Woche lang bebrütet.

Nach mikroskopischer Bestätigung des Vorhandenseins von Asken wurden die Zellen abzentrifugiert, 3mal gewaschen, mit 3 ml m/20 KH_2PO_4 aufgenommen und 1 ml hiervon mit 0,5 ml verdünnter Schneckenenzym-Suspension [1 ml Suc digestif d'helix pomatia (Industrie biologique française, Gennevilliers-Seine) + 3 ml m/20 KH_2PO_4] zur Verdauung der Ascuswand versetzt und 12 Stunden bei 30° C geschüttelt. Danach wurden die Tetraden mikromanipulatorisch aufgetrennt und in übersichtlicher Weise auf Plättchen mit festem Vollmedium gebracht. Nach zweitägiger Bebrütung wurden nur vollständig angewachsene Tetraden abgeimpft, auf Schrägagar gelegt und anschließend auf die Aufspaltungsverhältnisse von Paarungstyp und Bedürfnigkeiten hin analysiert.

Hatten sich zu wenig vollständige Tetraden im Sporulationsansatz gebildet, so daß deren mikromanipulatorische Isolation mit Schwierigkeiten verbunden war, konnte in einigen Fällen auf die *M a s s e n i s o l a t i o n s t e c h n i k f ü r A s c o s p o r e n*, die im folgenden stichwortartig wiedergegeben sei, zurückgegriffen werden:

Benötigte Lösungen:

m/20 KH_2PO_4	:	(P)
Schneckenenzym:	1 ml + 3 ml P	(S)
Tween 80	: 0,5 ml + 100 ml P	(T)
Paraffinöl	:	(Ö)

Sporulationsansatz 2mal "waschen", mit 3 ml P aufnehmen. 2 ml hiervon + 1 ml S 12 Stunden bei 30° C schütteln, mit 5 ml P ver-

18) 0,1 % Glucose, 0,8 % Kaliumacetat, 0,2 % Kaliumchlorid, 0,04 % Magnesiumsulfat, 0,25 % Yeast-Extract (DIFCO), entmineralisiertes Wasser. Das Medium [Zusammensetzung nach McCLARY et al. 1959, verändert] wurde 15 min bei 120° C autoklaviert.

setzen, abzentrifugieren, mit 4 ml T aufnehmen, abzentrifugieren; Zentrifugat + 4 ml T : 45 sec Ultraschall [s. Fußnote 11, S. 11], Suspension mit 2 ml Ö versetzen, in 50 ml-ERLENMEYER-Kolben bringen, kräftig schütteln, abzentrifugieren.

Überstehende Ölschicht + 2 ml T + 2 ml Ö in 50 ml-ERLENMEYER-Kolben kräftig schütteln, abzentrifugieren.

0,2 - 0,5 ml Ölüberstand auf Platte mit festem "Testmedium" pipetieren, Öltropfen mit Glasspatel verstreichen, dann Glasspatel über drei weitere Platten führen. Bebrütung.

Diese im Prinzip auf EMEIS u. GUTZ (1958) und EMEIS (1958) zurückgehende Methode der Massenisolierung beruht darauf, daß sich Hefesporen lipophil, vegetative Zellen dagegen lipophob verhalten. Die Sporen werden sich daher in der Ölschicht, die übrigen Zellen am Boden der wäßrigen Phase sammeln. Durch Behandlung mit Ultraschall und dem Detergentium Tween 80 sollen zusammenhängende Sporen getrennt und erneute Aggregationen unterbunden werden.

Nach der Erörterung der benötigten hefegenetischen Techniken möge nun an einigen Beispielen ausführlicher demonstriert werden, wie sich aus dem bisher erhaltenen Stamm-Material beliebige Allelkombinationen in Haplonten beider Paarungstypen oder in PT-homozygoten Diplonten herstellen lassen und wie die einzelnen Genotypen mit Hilfe der *Tetradenanalyse* gesichert werden können. Daran anschließend soll gezeigt werden, wie sich durch Kreuzung dieser Stämme untereinander die für die nachfolgenden Untersuchungen benötigten tri- und tetraploiden Systeme mit einer abgestuften Folge bestimmter Gendosen aufbauen lassen.

Als erstes Beispiel sei die bereits auf S. 15 [s. auch Abb. 4, S. 18] erwähnte Kreuzung des supprimierten Stammes A 1011 A/1 [Genotyp: $a ad_{2-1}^+ s^+ = a t s$] mit dem Wildtyp-Haplonten 100 [Genotyp: $\alpha ad_2^+ s^- = \alpha + -$] herausgegriffen:

$$a t s \quad x \quad \alpha + - \quad \longrightarrow \quad \alpha a t + s - .$$

Es liegt eine Dreifaktorkreuzung *ungekoppelter* Merk-

male vor. Während der Sporulation werden die Paarungstypen a oder α , die ad_2 -Allele $+$ oder t und die su_1 -Allele $-$ oder s mit der Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % auf die haploiden Tochterzellen verteilt, die somit folgende 8 verschiedenen Genotypen aufweisen können:

A) Wildtyp:	$a + - , \alpha + -$
B) temperaturabhängig Adenin-auxotropher Typ:	$a t - , \alpha t -$
C) supprimierter A-Typ:	$a + s , \alpha + s$
D) supprimierter B-Typ:	$a t s , \alpha t s$

Während sich die Genotypen der Klassen B und D wegen ihres unterschiedlichen Temperaturverhaltens eindeutig bestimmen lassen [s. Tabelle 2, S. 17], ist eine Differenzierung zwischen A und C aufgrund phänomenologischer Merkmale nicht mit Sicherheit möglich [s. S. 16]. Werden jedoch alle vier Sporen einer Tetrade auf die in Tabelle 2 angeführten Kriterien hin geprüft, so kann aus der Aufspaltung der Tetraden in bestimmten Fällen eine sichere Zuordnung auch dieser Genotypen getroffen werden (s.u.).

Unter Vernachlässigung des Paarungstyps ist die Entstehung dreier Tetraden Typen [Parentaler Dityp (PD), Tetratyp (T), Rekombinationsdityp (RD) - s. hierzu z.B. ESSER u. KUENEN 1965] möglich:

PD	T	RD
$t s$	$t s$	$t -$
$t s$	$t -$	$t -$
$+ -$	$+ s$	$+ s$
$+ -$	$+ -$	$+ s$

Treten in einer Tetrade zwei Sporen der Klasse B auf, dann müssen die beiden anderen der Klasse C angehören (Rekombinationsdityp). Durch Kreuzung gegen einen Haplonten der Klasse B kann beim Auftreten der Klasse D in der Tochtergeneration der Genotyp $ad_2^+ s^+$ als gesichert angesehen werden.

Die Bestimmung des Paarungstyps erfolgt durch Kreuzungsversuch gegen die beiden Elternstämme oder gegen andere Stämme bekannten Paarungstyps und mikroskopische Überprüfung der Zygotenbildung.

Zum genetischen Nachweis PT-homozygoter Diplonten wird der zu testende Stamm gegen einen sicheren Haplonten komplementären Paarungstyps gekreuzt und nach Sporulation des Kreuzungsproduktes (Triplont) eine Tetradanalyse oder Massensporenisolation vorgenommen.

Handelt es sich z.B. um einen aa-Diplonten [Kreuzung: aa x α —→ aa α], so müssen im Sporulationsansatz folgende drei Tetradentypen zu finden sein:

I		II		III	
aa	[α]	aa	[α]	a α	[0]
aa	[α]	a α	[0]	a α	[0]
α	[a]	a	[α]	a	[α]
α	[a]	α	[a]	a	[α]

[a] = Zygotenbildung bei Kreuzung gegen einen a α -Stamm,
[α]

[0] = Sporulation

Bei der Massentechnik sollten nach EMEIS u. WINDISCH (1960, 1960*) im PT-Test 50 % [33,3 % aa, 16,7 % a] mit einem α -Stamm, 16,7 % [α] mit einem a-Stamm Zygoten bilden, 33,3 % [a α] dürfen nicht kopulieren, müssen aber sporulieren können. Auf diese Weise ist eine eindeutige Entscheidung zwischen PT-homozygoten Diplonten und Haplonten [Aufspaltungsverhältnisse in einem derartigen Experiment: 50 % a und 50 % α] möglich.

PT-homozygote, jedoch im ad₂-Locus heterozygote Diplonten können durch Kreuzung gemäß aa oo x a α ++ —→ aaaa ++oo erhalten werden. Sporula-

tion und Tetradenanalyse des entstandenen Tetraplonten liefern für den ad -Locus folgende Tetradentypen:

2

<u>X</u>		<u>Y</u>		<u>Z</u>	
oo	[rot]	oo	[rot]	+o	[weiß]
oo	[rot]	+o	[weiß]	+o	[weiß]
++	[weiß]	+o	[weiß]	+o	[weiß]
++	[weiß]	++	[weiß]	+o	[weiß]

[In Klammern ist die Koloniefarbe der Diplonten mit den angeführten Genotypen auf festem "Testmedium" bei Temperaturen zwischen 20° und 40° C angegeben.]

Wie aus der Aufstellung hervorgeht, lassen nur die Z-Typen wegen der Rezessivität des ad_2^0 -Allels [die Hybriden vom Genotyp +o sind wie die homozygoten Wildtypen (++) nicht Adenin-bedürftig, bilden also immer weiße Kolonien] eine eindeutige Bestimmung der im ad_2 -Gen heterozygoten Diplonten zu.

Nach Bestimmung der Paarungstypen¹⁹, Isolation der PT-homozygoten Diplonten, Kreuzung zweier PT-komplementärer Z-Stämme und erneuter Tetradenanalyse kann der Genotyp +o als gesichert gelten, wenn die Adenin-Auxotrophie [oo] wieder herauspaltet.

Auch bei den in folgender Übersicht wiedergegebenen Kreuzungen liefern Tetradenanalysen nur in den Z-Typen mit befriedigender Sicherheit die gewünschten PT-homozygoten, im ad_2 - bzw. su_1 -Locus jedoch heterozygoten Diplonten:

-
- 19) Hat man mit Hilfe der auf S. 19 f. erörterten Genomverdopplung allein die für obige Kreuzung verwandten homozygoten Diplonten der Genotypen aa oo und $\alpha\alpha$ ++ erhalten, so lassen sich aus den X-Typen mit jeweils 16,7 % Wahrscheinlichkeit für aa bzw. $\alpha\alpha$ [cf. EMEIS u. WINDISCH 1960, 1960*] die beiden komplementären Genotypen aa ++ und $\alpha\alpha$ oo isolieren.

Kreuzung	Heterozygote Sporen vom Genotyp:	verhalten sich weitgehend wie homozygote Sporen vom Genotyp:
++ x tt	+t	++
tt x oo	to	tt
tt-- x ttss	tts-	tt--

Im Sinne der klassischen Genetik ist somit ad_2^+ dominant über ad_{2-1}^t , ad_{2-1}^t über ad_{2-2}^o und $su_1^- ad_{2-1}^t$ über $su_1^+ ad_{2-1}^t$.

Wie am Beispiel des Hybridensystems aus ad_2^+ - und ad_{2-2}^o -Allelen erläutert sei, reichen die hier beschriebenen Methoden aus, um beliebige Kombinationen zweier Allele in sonst isogenen und bis auf den PT-Locus homozygoten Tri- und Tetraplonten herzustellen.

Als Elternstämme stehen folgende Haplonten und PT-homozygoten Diplonten zur Verfügung:

a + , α +	aa ++ , αα ++
a o , α o	aa oo , αα oo
	aa +o , αα +o

In Tabelle 3 sind in übersichtlicher Weise die Kreuzungen zusammengestellt, die zu bestimmten Allelkombinationen und damit verschiedenen Gendosen p^+ [Anzahl der +-Allele / Ploidiegrad] führen.

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, lassen sich die meisten Allelkombinationen über mehrere (verschiedene) Kreuzungen gewinnen.

In der Praxis wurden jedoch gewöhnlich nur eine, manchmal zwei, einmal drei dieser Möglichkeiten ausgenutzt [s. S. 32 f.], um unnötigen Arbeitsaufwand zu vermeiden, da durch anschließende Sporulation und Tetradenanalyse der Genotyp der entstandenen Tri- und Tetraplonten gesichert werden mußte. In den Fällen, in denen von verschiedenen Kreuzungsmodi Gebrauch gemacht wurde, konnte ausnahmslos gleiches Verhalten der resultierenden Kreuzungsprodukte fest-

gestellt werden, so daß auch auf diese Weise die Isogenie und Homozygotie des genetischen Hintergrundes erwiesen wurde.

Tabelle 3

Allelkombination	Kreuzungen	Gendosis p^+
oooo	aaoo x ααoo	$0/4 = 0$
ooo	aaoo x α o , a o x ααoo	$0/3 = 0$
+ooo	aaoo x αα+o , aa+o x ααoo	$1/4 = 0,25$
+oo	aaoo x α + , aa+o x α o , a o x αα+o , a + x ααoo	$1/3 = 0,33$
++oo	aa++ x ααoo , aaoo x αα++ , aa+o x αα+o	$1/2 = 0,5$
++o	aa++ x α o , aa+o x α + , a + x αα+o , a o x αα++	$2/3 = 0,67$
+++o	aa++ x αα+o , aa+o x αα++	$3/4 = 0,75$
+++	aa++ x α + , a + x αα++	$3/3 = 1$
++++	aa++ x αα++	$4/4 = 1$

Das in der obigen Tabelle dargestellt Hybridensystem aus ad_2^+ - und ad_{2-2}^o -Allelen wird in der weiteren Arbeit als $\square +o \square$ -System²⁰ bezeichnet werden. Dieses System aus tri- und tetraploiden Stämmen liefert sieben Gendosen [$p^+ = 0; 0,25; 0,33; 0,5; 0,67; 0,75; 1$]. In Kapitel 4.1. werden Gründe angeführt werden, die eine Ineinanderschachtelung von Tri- und Tetraplonten zu einem System gerechtfertigt erscheinen lassen.

20) Um Verwechslungen mit gleichlautenden Genotyp-Bezeichnungen zu vermeiden, werden System-Namen in $\square \square$ gesetzt oder eingekreist [s. Abb. 16 u. 17].

Analog zum $\square + o \square$ -System wurden folgende weiteren Hybridensysteme aufgebaut und analysiert:

- $\square + t \square$ -System: Hybridensystem aus ad_2^+ - und ad_{2-1}^t -Allelen. Als Gendosis p^+ wird wie im $\square + o \square$ -System der Anteil der $+$ -Allele pro Ploidiegrad betrachtet.
- $\square to \square$ -System: Hybridensystem aus ad_{2-1}^t - und ad_{2-2}^o -Allelen. Gendosis $p^t = \text{Anteil der } t\text{-Allele} / \text{Ploidiegrad}$.
- $\square ts \square$ -System: Hybridensystem aus $su_1^- - ad_{2-1}^t$ [Wildtyp]- und $su_1^+ - ad_{2-1}^t$ -Allelen bei steter Homozygotie der t -Allele. Gendosis $p^s = \text{Anteil der } s^+ \text{- Allele pro Ploidiegrad}$.

Eine Übersicht über die verwendeten individuellen Stämme und ihre Entstehung erfolgt nach einem kurzen Abriß über ihre Nomenklatur.

2.4. Nomenklatur der Stämme

Da es für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen notwendig war, mit einer Vielzahl von Stämmen zu arbeiten, mußte deren Benennung nach einem logischen, gut einsichtigen Schema erfolgen, das sowohl ein sofortiges Ablesen aller wesentlichen Stammeigenschaften als auch ein Nachvollziehen der Entstehungsgeschichte jedes einzelnen Stammes ermöglicht.

Hierzu wurde eine Aneinanderreihung von Buchstaben und Ziffern gemäß folgender Vorschrift gewählt:

1. Einzelbuchstabe oder Buchstabenkombination zur Kennzeichnung der betroffenen ad_2 -Allele [$ad_2^+ \approx$ kein Buchstabe, $ad_{2-1}^t \approx A$, $ad_{2-2}^o \approx F$].
2. Kennzahl [Die im folgenden angegebenen Ziffernpositionen beziehen sich auf eine **v i e r** stellige Kennzahl. Bei einer dreistelligen Kennzahl müssen alle angeführten Positionswerte um 1 vermindert werden!]

1. Ziffer: Anzahl der a-Paarungstypallele. Weist der Stamm nur homozygote α -Konfiguration auf, entfällt die 1. Kennziffer [statt F 0220/2a ($\alpha\alpha$ oo) wird beispielsweise F 220/2a geschrieben].

2. Ziffer: Anzahl der α -Paarungstypallele.

1.+2. Ziffer: Ploidiegrad

3. Ziffer: Anzahl der mutierten ad_2 -Allele.

1.+2. Ziffer minus 3. Ziffer: Anzahl der ad_2^+ -Allele.

4. Ziffer: Anzahl der mutierten Suppressor-Allele.

1.+2. Ziffer minus 4. Ziffer: Anzahl der Suppressor-Wildtyp (s^-)-Allele.

3. Einzelbuchstabe oder Buchstabenkombination zur Kennzeichnung der mutierten Suppressor-Allele [Wildtyp $s^- \approx$ kein Buchstabe, $su_1^+ - ad_{2-1}^t \approx A$].

4. Eine durch Schrägstrich abgetrennte Herkunftsnummer [hin und wieder durch Kleinbuchstaben ergänzt] gestattet die Unterscheidung der bei verschiedenen Arbeitsgängen isolierten Stämme gleichen Genotyps. Manchmal erhielt der als erster isolierte Stamm eines bestimmten Genotyps keine Herkunftsnummer. Da es sich hierbei jeweils nur um einen einzigen Stamm handelt, ist eine eindeutige Zuordnung gewährleistet.

5. Bei Kreuzungen ergibt sich durch Addition der Kennzahlen der Elternstämme die Kennzahl des Kopulationsproduktes. Werden nur A- und F-Stämme untereinander [jedoch nicht miteinander] oder mit Wildtypstämmen gekreuzt, ist die Bezeichnung des Genotyps mit der Angabe des entsprechenden Einzelbuchstabens eindeutig [A 1010 x A 110 $\longrightarrow$ A 1120, nicht AA 1120 !], bei Hybriden aus A- und F-Stämmen muß eine Buchstabenkombination angeführt werden, wobei immer in der Reihenfolge a x α vorgegangen wird.

Beispiele:

- | | | | | | |
|----|-----------|---|----------|--------|-------------|
| 1. | 1000 | x | 200/5 | —————→ | 1200 |
| | a + | | αα ++ | | ααα +++ |
| 2. | AF 2020/3 | x | F 220/2a | —————→ | AFF 2240/2a |
| | aa to | | αα oo | | αααα tooo |

Sowohl der Genotyp als auch der Kreuzungsmodus können direkt aus der Stammbezeichnung AFF 2240 abgeleitet werden:

- Aus der Addition der 1. mit der 2. Kennziffer folgt, daß es sich bei diesem Stamm um einen Tetraplonten handelt.
- Die 3. Kennziffer gibt an, daß alle vier ad_2 -Gene mutiert sind.
- Da Tetraplonten in dieser Arbeit nur über die Kreuzung zweier komplementär-PT-homozygoter Diplonten hergestellt werden, eine Kreuzung A x FF jedoch wegen der per definitionem-Nichtexistenz eines Stammes FF [s. Punkt 5, S. 29] nicht möglich ist, folgt wegen der geforderten Reihenfolge a x α, daß eine Kreuzung AF x F mit AF 2020 und F 220 vorliegen muß.

Während der Genotyp immer eindeutig aus der Stammbezeichnung erschlossen werden kann, ist eine sichere Zuordnung des Kreuzungsmodus ohne Erweiterung der Vorschrift nicht in allen Fällen möglich, muß also - wenn nötig - anhand der Herkunftsnummer aus der Stammkartei abgelesen werden [Beispiel: Ein Stamm F 2230 kann sowohl aus F 2020 x F 210 als auch aus F 2010 x F 220 hervorgehen].

2.5. Übersicht über die verwendeten Stammsysteme

Nachdem in Abb. 4 [S. 18] die Entstehung einiger zum Aufbau höherploidier Stammsysteme verwendeter Haplonten aus LASKOWSKI's Ausgangsstamm 211-1b schematisch dargestellt wurde, sei in der Abb. 5 in übersichtlicher Weise gezeigt, wie sich aus ihnen die weiteren, in den Tabellen 4 - 7 als Elternstämme erwähnten Haplonten und PT-homo-

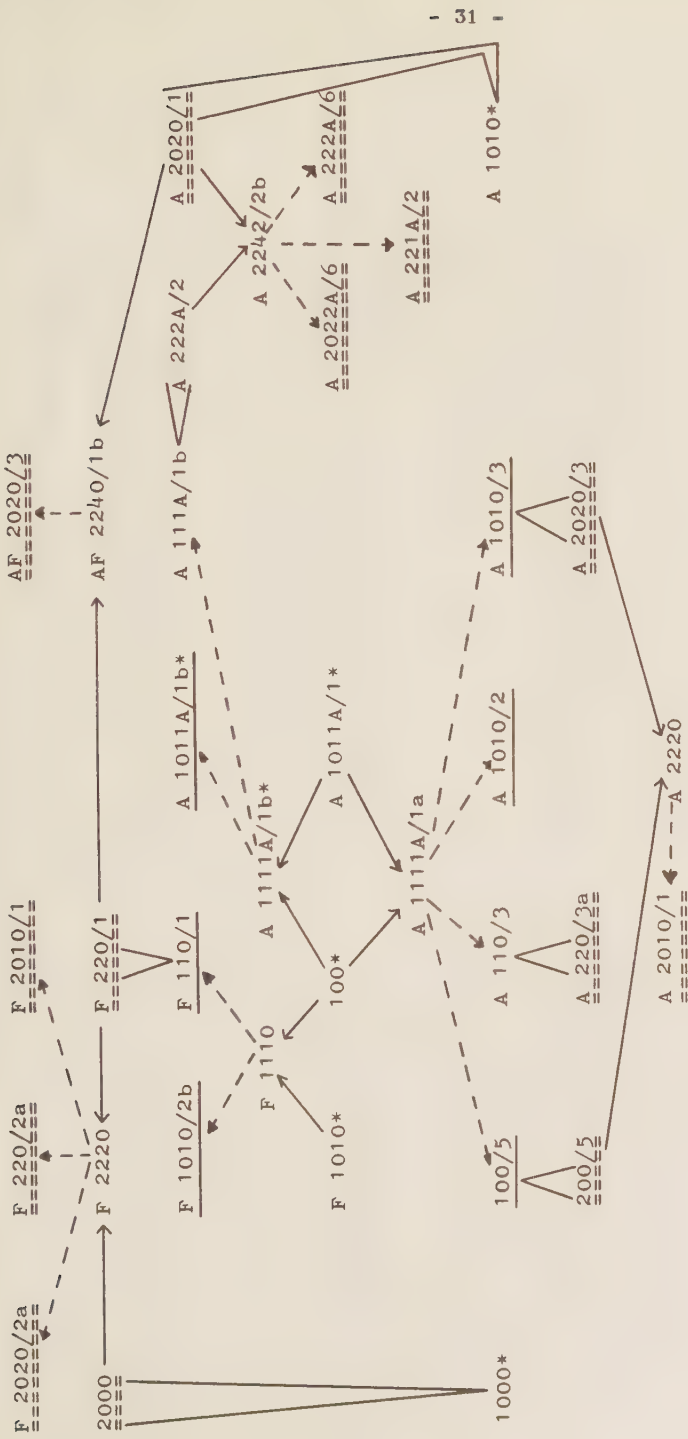


Abb. 5: Ableitung der in den Tabellen 4 - 7 als Elternstämme aufgeführten Haplonten und PT-homozygoten Diplonten aus den in Abb. 4 (S. 18) erhaltenen Stämmen (Kennzeichnung durch*). Sie wurden gewonnen durch Genomverdopplung (◁), Kreuzung (→), Sporulation und Tetradenanalyse (---→).

zygoten Diplonten ableiten.

Tabelle 4: [+o] -System [Gendosis p⁺]

p ⁺	Genotyp	Stamm	Entstehung		
0	oooo	F 2240/1a	F 2020/2a	x	F 220/2a
	ooo	F 1230	F 1010/2b	x	F 220/2a
0,25	+ooo	F 2230/2a	F 2010/1	x	F 220/2a
0,33	+oo	F 1220	1000	x	F 220/1
		F 2120/1a	F 2020/2a	x	100/5
0,5	++oo	F 2220	2000	x	F 220/1
		F 2220/2	F 2020/2a	x	200/5
0,67	++o	F 2110	2000	x	F 110/1
		F 2110/1a	F 2010/1	x	100/5
0,75	+++o	F 2210/1a	F 2010/1	x	200/5
1	+++	1200	1000	x	200/5
	++++	2200	2000	x	200/5

Tabelle 5: [+t] -System [Gendosis p⁺]

p ⁺	Genotyp	Stamm	Entstehung		
0	tttt	A 2240/1b	A 2020/1	x	A 220/3a
0,25	+ttt	A 2230	A 2010/1	x	A 220/3a
0,33	+tt	A 2120	A 2020/3	x	100/5
		A 2120/1b	A 2020/1	x	100/5
		A 1220/1a	1000	x	A 220/3a
0,5	++tt	A 2220	A 2020/3	x	200/5
0,67	++t	A 1210/1a	A 1010/2	x	200/5
0,75	+++t	A 2210	A 2010/1	x	200/5

Forts. Tabelle 5

1	+++	1200	1000	x	200/5
	++++	2200	2000	x	200/5

Tabelle 6: □ to □ -System [Gendosis p^t]

p ^t	Genotyp	Stamm	Entstehung		
0	oooo	F 2240/1a	F 2020/2a	x	F 220/2a
	ooo	F 1230	F 1010/2b	x	F 220/2a
0,25	tooo	AFF 2240/2a	AF 2020/3	x	F 220/2a
0,33	too	AF 1230	A 1010/3	x	F 220/1
0,5	ttoo	AF 2240/1a	A 2020/1	x	F 220/1
0,67	tto	AF 2130/2a	A 2020/3	x	F 110/1
0,75	ttto	AFA 2240	AF 2020/3	x	A 220/3a
1	tttt	A 2240/1b	A 2020/1	x	A 220/3a

Tabelle 7: □ ts □ -System [Gendosis p^s]

p ^s	Genotyp	Stamm	Entstehung		
0	tttt----	A 2240/1b	A 2020/1	x	A 220/3a
0,25	tttts---	A 2241A/1	A 2020/1	x	A 221A/2
0,33	ttt s--	A 1231A/1	A 1010/2	x	A 221A/2
0,5	ttttss--	A 2242A/4	A 2020/1	x	A 222A/6
0,67	ttt ss-	A 1232A/1	A 1011A/1b	x	A 221A/2
1	tttsssss	A 2244A/1	A 2022A/6	x	A 222A/6
	ttt sss	A 1233A/1	A 1011A/1b	x	A 222A/6

3 . D I E W A C H S T U M S G E S C H W I N D I G K E I T A L S P H Ä N O T Y P I S C H E R P A R A M E T E R

Werden Hefezellen in ein frisches Nährmedium inokuliert und bei geeigneten Temperaturen bebrütet, so vermehrt sich die Zellpopulation in einer für alle Mikroorganismen charakteristischen Weise [s. z.B. HAWKERS et al. 1962]:

Nach einer mehr oder weniger kurzen Anlaufzeit [l a g -Phase], während der die Zellen ihren Metabolismus an die neuen Umweltgegebenheiten anpassen und deren Dauer von Erbgut, Alter der Vor-
kultur, Zusammensetzung des Mediums und Bebrütungstemperatur abhängt, nimmt die Zellzahl langsam zu [Beschleunigungsphase] und geht mehr oder minder schnell in eine exponentielle Vermehrung ["logarithmische" Phase, l o g -Phase] über. Verarmt das Medium mit der Zeit an wichtigen Nährsubstanzen oder reichern sich toxische Stoffwechselprodukte an, stagniert das Wachstum der Population [stationäre Phase, s t a t -Phase] nach Durchlaufen einer Verzögerungsphase.

Bei guter Durchlüftung und einem relativ zur Stickstoffquelle geringen Glucose-Angebot zeigen atmungsintakte Hefepopulationen im Anschluß an die log-Phase als Spezificum zusätzlich eine Alkoholverbrennungs- [A v -] Phase, während der nach Erschöpfung des Glucosevorrates das durch partielle Gärung entstandene Äthanol veratmet wird [s. Abb. 6, vergl. auch POHLIT et al. 1966].

Trägt man nun den Logarithmus der Zellkonzentration [die durch direkte Auszählung unter dem Mikroskop (Zählkammer) oder durch Messung der optischen Dichte (Extinktion) mit Hilfe eines Kolorimeters bestimmt werden kann] in Abhängigkeit von der Zeit auf, so erhält man für die l o g - P h a s e e i n e G e r a d e, deren Bedeutung aus folgenden Überlegungen hervorgeht:

In einem konstanten Volumen ist die zeitliche Zunahme $\dot{N}$ [= dN/dt] der Anzahl N der vorhandenen Zellen proportional:

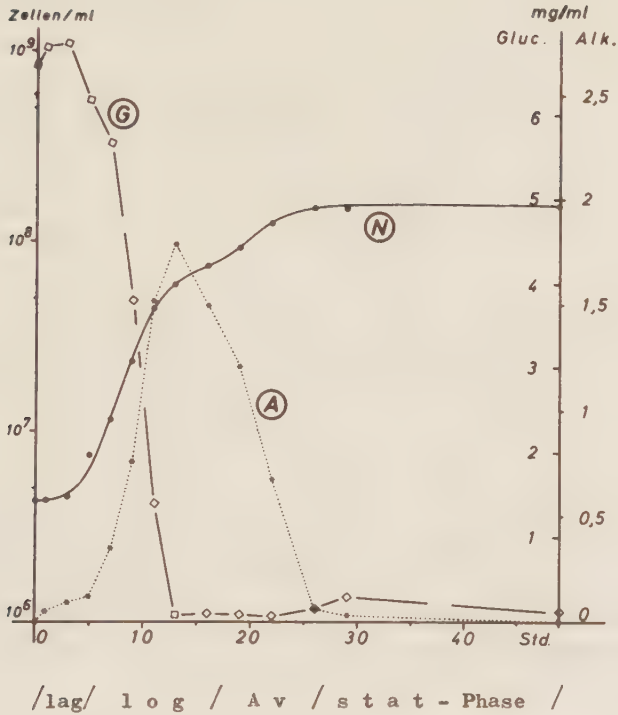


Abb. 6: Der zeitliche Verlauf von Zelltitern (N), Glucose (G) - und Äthanol (A) -Gehalt des Mediums nach Inokulation von $1,3 \cdot 10^9$ Zellen des diploiden Stammes 211 (LASKOWSKI) in 300 ml eines flüssigen Minimalmediums [2 g Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (DIFCO) + 2 g Glucose + 300 ml entmineralisiertes Wasser]. Die Alkoholbestimmung erfolgte nach der ADH (BOEHRINGER)-, die Glucosebestimmung nach der GOD-POD (BOEHRINGER)-Methode. Die Zellen wurden unter Schütteln in einem 1 l-ERLENMEYER-Kolben bei 30°C bebrütet.

$$(1) \quad \dot{N} = \mu \cdot N,$$

wobei μ [Dimension: h^{-1}] als Maß für die Vermehrungsgeschwindigkeit angesehen werden kann.

Durch Integration von (1) erhält man

$$(2a) \quad \ln N = \ln N_0 + \mu \cdot t \quad \text{bzw.}$$

$$(2b) \quad \ln [N/N_0] = \mu \cdot t \quad \text{oder}$$

$$(2c) \quad N = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

Der Zusammenhang zwischen der Wachstumskonstanten μ und der Generationsdauer g , der Zeit also, die für eine Verdopplung der Population in der log-Phase benötigt wird [$N_2 = 2 \cdot N_1$], ist durch

$$(3) \quad \mu \cdot g = \ln 2 \quad \text{gegeben.}$$

Je schneller die Population nun in der log-Phase wächst, desto größer ist der Betrag von μ , der in erster Linie vom Genotyp der Zellen, vom Medium und von der Bebrütungstemperatur, jedoch auch vom Anfangstiter abhängt. Werden zuviel Zellen inokuliert, so kann wegen vorzeitiger Erschöpfung des Nährmediums die Ausbildung einer logarithmischen Phase ganz unterbleiben.

Unter Konstanthaltung von Temperatur und Anfangstiter scheint somit die Wachstumsgeschwindigkeit μ [bzw. die Generationsdauer g] bei Verwendung von Stammreihen mit isogenem, homozygotem genetischen Hintergrund und einem Minimalmedium definierter Zusammensetzung einen geeigneten phänotypischen Parameter für die Untersuchung von Gendosiswirkungen darzustellen.

Da - wie bereits erwähnt wurde - ad_2 -Mutanten zu "Rückmutationen" neigen, erwies sich die Messung der Wachstumsgeschwindigkeiten in flüssigem Kulturmedium als problematisch. Aus diesem Grunde wurde - einer Anregung von GILMORE 1966 folgend - ein Petrischalen-Photometer konstruiert, das die optische Mes-

sung der Zelldichte auf festem Agar, auf dem Rückmutanten nur singuläre Kolonien bilden, nicht jedoch die ganze Population durchsetzen, ermöglicht.

3.1. Beschreibung des Petrischalen-Photometers. Eichkurve.

Das Funktionsprinzip des Petrischalen-Photometers sei an seinem, in Abb. 7 wiedergegebenen Schaltplan erläutert:

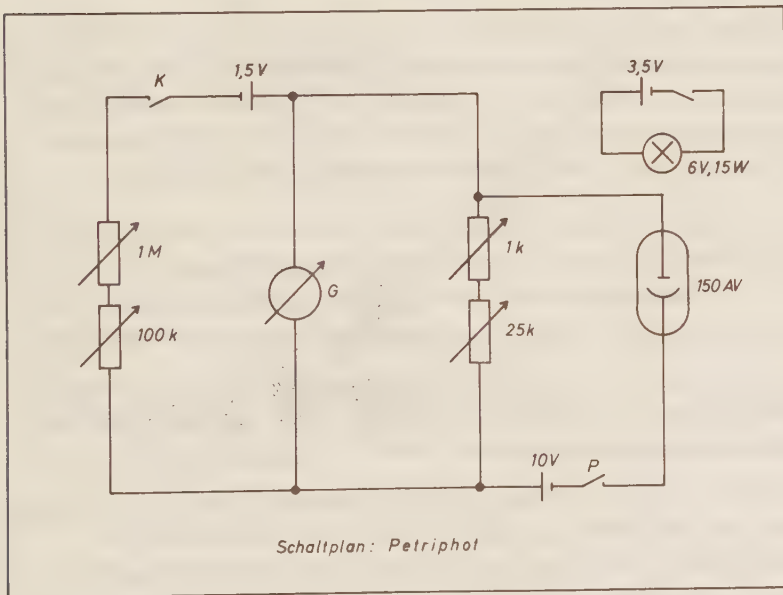


Abb. 7: Schaltplan des Petrischalen-Photometers [Einzelheiten s. Text].

Treffen die Photonen einer Lichtquelle²¹ auf die Kathode einer unter Spannung stehenden Photozelle²², so fließt ein mit einem Galvanometer [G] meßbarer elektrischer Strom, der dem auffallenden Lichtstrom über einen bestimmten Bereich proportional ist. Zur Durchführung von Absorptions- (bzw. Extinktions-) Messungen wird der ohne absorbierendes Agens fließende Photostrom durch Anlegen eines entgegengerichteten Stromes²³ kompensiert [Galvanometer-Anzeige: 0]. Die beiden kontinuierlich regelbaren Galvanometer-Vorschaltwiderstände²⁴ ermöglichen den Abgleich auf die Skalenanzeige 100 bei vollständiger Absorption [realisiert durch das Vorklappen eines schwarzen Bleches].

Wird nun ein absorbierendes Agens in den Lichtweg gebracht, so zeigt die Galvanometerskala die Absorption in % an.

Bei der Bestimmung der Zelldichte in f l ü s s i g e n Medien mit Hilfe des LANGE-Kolorimeters hat es sich gezeigt, daß der Zell-titer über einen relativ großen Bereich zwar nicht der Absorption A, jedoch der Extinktion $E [= \lg (100 / 100 - A), A \text{ in } \%]$ proportional ist und somit dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz gehorcht.

Um die Gültigkeit dieses Gesetzes auch für die Zelldichte-Bestimmung mit Hilfe des beschriebenen Petrischalen-Photometers auf f e s t e m Agar zu prüfen, wurde eine Petrischale mit einer ca. 3 mm dicken Nähragarschicht (Minimalmedium) begossen und auf eine

21) REUTER-Lampe mit Irisblende, $\varnothing$ 3 cm, OSRAM-Glühbirne (Nr. 8017) 6 V, 15 W, betrieben mit 3,5 - 4 V.

22) VALVO 150 AV, Hochvakuum, wirksame Kathodenfläche $7,1 \text{ cm}^2$, Empfindlichkeitsmaximum bei 420 nm, $60 \mu\text{A}/\text{lm}$ bei 2850°K , Dunkelstrom $< 10^{-6} \mu\text{A}$, max. Kathodenstromdichte $5,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, angelegte Speisespannung 10 - 20 V [$U_{a,\text{max}} = 100 \text{ V}$].

23) Spannungsquelle 1,5 V, kontinuierlich regelbare Abgleichwiderstände 1 M Ω , 100 k Ω .

24) 25 k Ω , 1 k Ω .

Hälfte der Platte ein dünner Rasen eines diploiden Hefestammes [1100 $\leftarrow$ 1000 x 100] gestempelt. Nach verschiedener Bebrütungs-
dauer wurde die Extinktion des Rasens relativ zum reinen Medium [Extinktion 0] mit dem Petrischalen-Photometer gemessen und gleich
danach ein knapp 1 cm² großes Rasenstück mit einem Korkbohrer her-
ausgestochen, in 4 ml m/20 KH₂PO₄ aufgeschwemmt und durch mikrosko-
pische Auszählung in einer Hämatocytometerkammer der Zelltitler der
Suspension bestimmt. Durch Rückrechnung konnte dann die Zelldichte
pro cm² Agarfläche ermittelt werden.

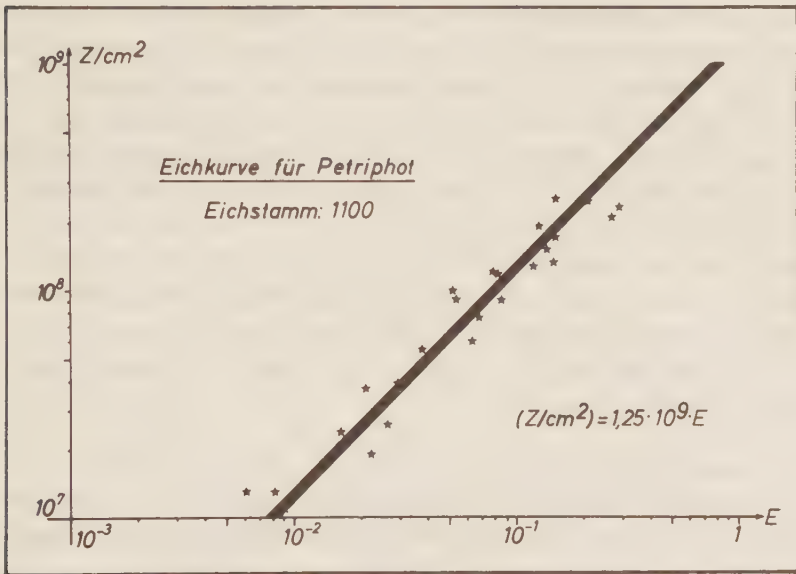


Abb. 8: Eichkurve für das Petrischalen-Photometer.

Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, kann die Zelldichte [Z/cm^2] in dem untersuchten Bereich von $E = 10^{-2}$ [$A \approx 2,3\%$] bis $E = 2 \cdot 10^{-1}$ [$A \approx 37\%$] der mit dem Petrischalen-Photometer gemessenen Extinktion E als proportional gelten.

3.2. Durchführung der Messungen

Wie aus den Ausführungen auf S. 36 hervorgeht, müssen die Wachstumsmessungen unter streng standardisierten Bedingungen [Konstanz der Zusammensetzung und der physikalischen Eigenschaften des Mediums, der Temperatur und des Anfangstiters] vorgenommen werden, um die Ergebnisse verfälschende, unkontrollierbare Parameter soweit wie möglich auszuschalten.

Es wurde daher ausschließlich das bereits erwähnte [s. S. 14, Fußnote 13] synthetische *M i n i m a l m e d i u m* [10 g Agar (DIFCO) + 15 g Glucose + 10 g Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (DIFCO)²⁵ auf 500 ml entmineralisiertes Wasser], das keine Nukleinsäurebasen enthält, verwandt. Das Gemisch wurde in einem 1 l-ERLENMEYER-Kolben zubereitet und nach Verschuß mit einem Wattebausch auf einem Magnetrührer unter Benutzung großer, Teflon-umkleideter Rührstäbchen bei angeschalteter Heizplatte gelöst, danach 15 min bei 120° C autoklaviert und nach Abkühlung in einem Wasserbad [40°C] mit einem 20 ml-Kippautomaten²⁶ auf trocken sterilisierte Petrischalen²⁷ verteilt. Die Platten wurden bis zu ihrer Verwendung etwa 40 Stunden bei 30° C gelagert.

Die zu untersuchenden *S t ä m m e* [s. S. 32 f.] wurden bei 4° C auf Schrägagar aufbewahrt. Für jedes Experiment wurde eine kleine Impföse voll entnommen und auf eine Minimalagarplatte (s.o.) ausgestrichen, für 2 Tage bei 25° C bebrütet, nach Halbierung des Agars

25) Zusammensetzung s. DIFCO-Manual 1953.

26) Ausfluß bei 20° C: $[19,5 \pm 0,69]$ ml. [Mittelwert aus 10 Messungen, 3fache Standardabweichung].

27) Durchmesser: $[8,9 \pm 0,16]$ cm. [Mittelwert aus 10 Messungen, 3fache Standardabweichung].

Aus den beiden angegebenen Daten resultiert eine Dicke der Agarschicht von $[3,2 \pm 0,15]$ mm.

mit einem Spatel [die weniger gleichmäßig bewachsene Hälfte wurde verworfen] auf eine frische Platte übergestempelt und für weitere 3 Tage bei 25° C bebrütet [= Vorkultur-Platten].

Die Unterseite der für die Wachstumsmessungen verwandten Petrischalen wurde mit einem wasserunlöslichen Filzschreiber gemäß Abb. 9 gerastert. An der mit "K" gekennzeichneten Stelle wurde zunächst der auf S. 38 beschriebene Null- und Endabgleich vorgenommen, dann die Extinktion der durch "M" markierten Seite bestimmt.

Nach dieser Kontrollmessung, die der Korrektur von Unebenheiten des Agars diene, wurden jeweils 5 Platten auf der "M"-Seite mit dem auf einer Vorkulturplatte gewachsenen Rasen möglichst gleichmäßig bestempelt. Lag die Anfangsextinktion des aufgestempelten Rasens nicht zwischen $E = 0,01$ und $E = 0,02$, wurde die Schale verworfen.



Abb. 9: Berasterung der Meßplatten.

Die B e b r ü t u n g der Meßplatten erfolgte in einem elektronisch gesteuerten KÖTTERMANN-Brutschrank (Typ 2720), der mindestens zwei Tage vorher auf die für die jeweilige Versuchsserie gewünschte Temperatur eingestellt worden war.

In Zeitintervallen von ein oder zwei Stunden wurden die bebrüteten Platten kurzfristig zur Messung, die bei Raumtemperatur erfolgte, entnommen. Da immer alle Stämme eines der vier Systeme [Tabellen 4-7, S. 32 f.] in einem Versuch gemessen wurden, dürfte der jeweilige, methodisch nur durch Temperierung des Raumes zu vermeidende Temperatursprung für das Endergebnis, bei dem es in erster Linie auf die relativ zur Gendosis 1 resultierenden Wachstumsgeschwindigkeit ankommt, von untergeordneter Bedeutung sein.

Für jede Platte wurden die Extinktionswerte nach der auf S. 41 erwähnten Korrektur in Abhängigkeit von der Zeit in ein zweidekadesches halblogarithmisches Raster eingetragen und die der logarithmischen Wachstumsphase zugehörigen Punkte durch eine von der 0. zur 2. Dekade reichenden Gerade bestmöglich verbunden.

Die zeitliche Differenz der Schnittpunkte dieser Geraden mit der 0. und 2. Dekade gibt die für eine 100fache Zunahme der Population benötigte Zeit $\hat{=}$ t an.

Aus Gl. (2b) [S. 36] folgt dann

$$(4a) \quad \mu = \frac{[\ln 100]}{\hat{=} t} \quad \text{bzw. mit Gl. (3)}$$

$$(4b) \quad g = \frac{\hat{=} t}{[1d 100]}$$

mit den Zahlenwerten $[\ln 100] = 4,6$ und $[1d 100] = 6,64$.

Zur statistischen Absicherung der Befunde wurden im Schnitt pro Stamm und Temperatur 15 Platten gemessen, wobei für die Bestimmung von $\hat{=} t$ jeweils mindestens 5 Punkte in der log-Phase zur Verfügung standen. Aus den einzelnen Zeitintervallen $\hat{=} t$ wurde der Mittelwert gebildet, das 95 %-Mutungsintervall für den Mittelwert nach dem zweiseitigen t-Verfahren (STUDENT) bestimmt und anschließend auf die Wachstumsgeschwindigkeit μ umgerechnet.

4 . E R G E B N I S S E

4.1. Ploidiegradabhängigkeit von Wachstumsgeschwindigkeit und

Zellvolumen

Um ein möglichst weites Spektrum an Gendosen untersuchen zu können, wurden tri- und tetraploide Stämme "ineinandergeschachtelt" [s. S. 27, 32 f.].

Ein derartiges Vorgehen ist jedoch nur gerechtfertigt, wenn sich die zusammengehörenden, bis auf den PT-Locus homozygoten Tri- und Tetraplonten unter gleichen Umweltbedingungen weder in ihren Wachstumsgeschwindigkeiten, noch in der Konzentration irgendwelcher wesentlicher Zellbestandteile unterscheiden.

Wie verschiedene Autoren [s. z.B. POHLIT et al. 1966] zeigen konnten, nimmt im allgemeinen die Wachstumsgeschwindigkeit isogener Stämme unter gleichartigen Bedingungen vom Haplonten bis zum heterozygoten Diplonten zu, um dann mit höheren Ploidiegraden wieder leicht abzufallen, jedoch sind auch Ausnahmen von dieser Regel bekannt [s. z.B. MÜLLER 1965].

Zur Klärung des Verhaltens der in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurde daher die Ploidiegradabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit für die bis auf den PT-Locus homozygoten Wildtypstämme mit der in Kapitel 3.2. geschilderten Methode bei 25° und 30° C verfolgt [s. Tabelle 8].

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, überschneiden sich die Fehlergrenzen der Wachstumsgeschwindigkeiten der Tri- und Tetraplonten so stark, daß kein signifikanter Unterschied zwischen ihnen angenommen werden kann. Da bei den übrigen Homozygoten analoge Verhältnisse anzutreffen sind, ergeben sich aus den Wachstumsgeschwindigkeiten keine Gründe, die gegen die Zusammenfassung tri- und tetraploider Stämme zu einem System sprechen.

Tabelle 8

Stamm	Genotyp	Wachstumsgeschwindigkeit μ [h^{-1}] bei	
		25° C	30° C
1000	a +		0,278 (16) ²⁸
100/5	α +	0,206 (7)	0,274 (11)
2000	aa ++	0,210 (9)	0,286 (11)
200/5	$\alpha\alpha$ ++		0,290 (8)
1100	$\alpha\alpha$ ++	0,228 (7)	0,305 (8)
1200	$\alpha\alpha\alpha$ +++	0,231 (5)	0,295 (10)
2200	$\alpha\alpha\alpha\alpha$ ++++	0,229 (5)	0,300 (10)

LASKOWSKI (1960, 1962) und LASKOWSKI et al. (1960) konnten nun belegen, daß in weitestgehend isogenen und homozygoten Stammreihen sowohl das Zellvolumen als auch Trockengewicht, DNS-, RNS- und Vitamin [Folsäure, Nicotinsäure, Pantothensäure, Thiamin] -Gehalt in guter Näherung linear mit dem Ploidiegrad korreliert sind, woraus gleiche Konzentrationen dieser Stoffe in den verschiedenen Zellen zu folgern sind.

Wie aus der Abb. 10 hervorgeht, trifft die lineare Korrelation zwischen Zellvolumen²⁹ und Ploidiegrad auch für die hier untersuchten Stämme zu. Es gibt keine Gründe, die eine Ausweitung dieses Zusammenhanges auf Trockengewicht und Zellbestandteile ungerechtfertigt erscheinen lassen würden. Das sei deshalb betont, weil die Inter-

28) Die geklammerten Zahlen geben die nach dem zweiseitigen t-Verfahren errechneten $\pm$ -Abweichungen für die letzten Stellen des zitierten Wertes bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % wieder. 0,278 (16) ist also als $0,278 \pm 0,016$ zu lesen.

29) Die Zellvolumina wurden - wie von LASKOWSKI 1962 angegeben - durch mikroskopisches Ausmessen [6faches Mikrometer-Okular] der langen [a] und kurzen [b] Achsen von jeweils 50 Zellen aus (Forts. S. 45 unten)

pretation der auf den folgenden Seiten dargestellten Gendosiswirkungen auf derartigen Voraussetzungen fußt.

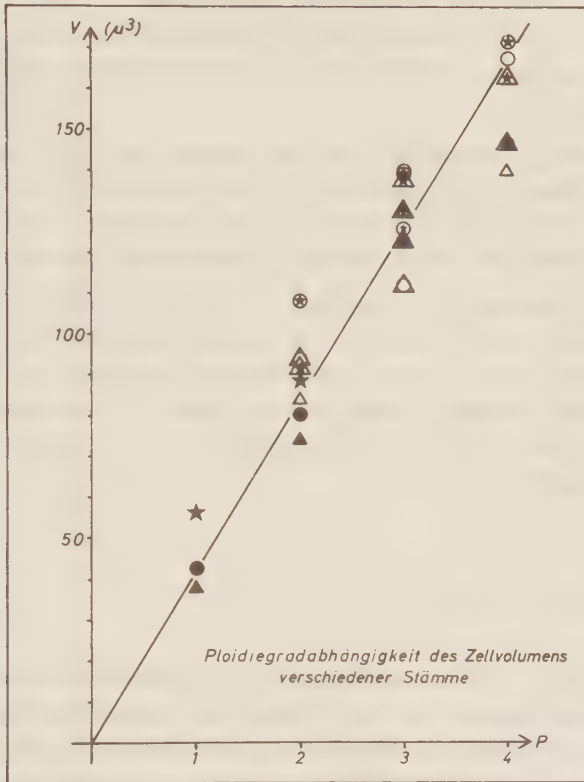


Abb. 10: Ploidiegradabhängigkeit des Zellvolumens verschiedener in dieser Arbeit hergestellter, hier nicht näher bezeichneter Stämme.

29) Forts.: der stationären Phase und anschließende Berechnung für ein Rotationsellipsoid $[V = \frac{4}{3} \pi ab^2]$ bestimmt.

Bevor nun über die eigentlichen Meßergebnisse berichtet wird, seien noch einmal die wesentlichen Punkte der bisherigen Ausführungen zusammengefaßt:

1. Es werden vier weitestgehend isogene und bis auf den PT-Locus homozygote tri- und tetraploide Stammsysteme ($\square +o \square$, $\square +t \square$, $\square to \square$, $\square ts \square$) vorgestellt, die sich jeweils n u r in der Kombination zweier Allele eines Gens [verschiedene Gendosen] unterscheiden.
2. Unter streng standardisierten Bedingungen wird als phänotypischer Parameter die Auswirkung dieser verschiedenen Gendosen auf die Wachstumsgeschwindigkeit [auf Minimalagar] der entsprechenden Stämme bei verschiedenen Temperaturen gemessen.
3. Eine Ineinanderschachtelung tri- und tetraploider Stämme innerhalb eines Systems scheint erlaubt, da die zusammengehörenden Homozygoten weder in ihren Wachstumsgeschwindigkeiten signifikant differieren noch irgendwelche Gründe für ploidiegradabhängige Unterschiede in den Konzentrationen wichtiger Zellbestandteile sprechen.

4.2. Das $\square +o \square$ -System

Als erstes seien die Ergebnisse für das Stammsystem beschrieben, das wegen der Kombination von Allelen, die einerseits zur Bildung optimal aktiver [ad_2^+], andererseits zur Bildung vollständig inaktiver [ad_{2-2}^o] Enzymmolekeln führen dürften, in gewisser Weise die Bedeutung eines Bezugssystems für die folgenden Erörterungen hat.

Die aus den verschiedenen Allelkombinationen [die entsprechenden Stämme sind in der Tabelle 4, S. 32 aufgeführt] resultierenden Wachstumsgeschwindigkeiten μ [bzw. Generationsdauern g] sind in der Tabelle 9 mit ihren beidseitigen Abweichungen (t-Test für die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, s. S. 42) für verschiedene Temperaturen übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 2

T	Genotyp	oooo ooo	+ooo	+oo	+oo	++o	+++	++++ +++
[°C]	p ⁺	o	0,25	0,33		0,67	0,75	1
20	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o		5,30 (21) 0,131 (5)	5,19 (20) 0,133 ₅ (5) ³¹	5,00 (13) 0,139 (4)		4,91 (13) 0,141 (4)
25	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o	3,55 (14) 0,195 (8)	3,29 (7) 0,210 (4)	3,19 (6) 0,217 (4)	3,07 (4) ₅ 0,226 (3)	3,10 (19) 0,224 (14)	3,02 ₅ (4) 0,229 (3)
28	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o	2,91 (15) 0,238 ₅ (12)	2,57 (9) 0,270 (9)	2,38 (9) 0,291 (11)	2,38 (12) 0,291 (15)	2,37 (10) 0,293 (12)	2,32 (8) ₅ 0,298 (11)
30	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o		2,58 (7) 0,269 (7) ₅	2,49 (8) 0,278 (9)	2,34 ₅ (4) 0,296 (5)		2,33 (5) 0,298 (6) ₅
35	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o	2,22 (13) 0,313 (18)	2,02 (8) 0,343 (14)	1,94 (7) 0,357 (12)	1,81 (4) 0,383 (8)	1,82 ₅ (5) 0,380 (11)	1,77 (3) 0,392 (6)
40	g[h] μ[h ⁻¹]	∞ o		2,78 (11) 0,250 (10)	2,70 (6) 0,256 (5)	2,53 (7) 0,274 (7) ₅		2,50 (6) 0,277 (6)

³¹⁾ 0,133₅ (5) = 0,133₅ ± 0,005 h⁻¹

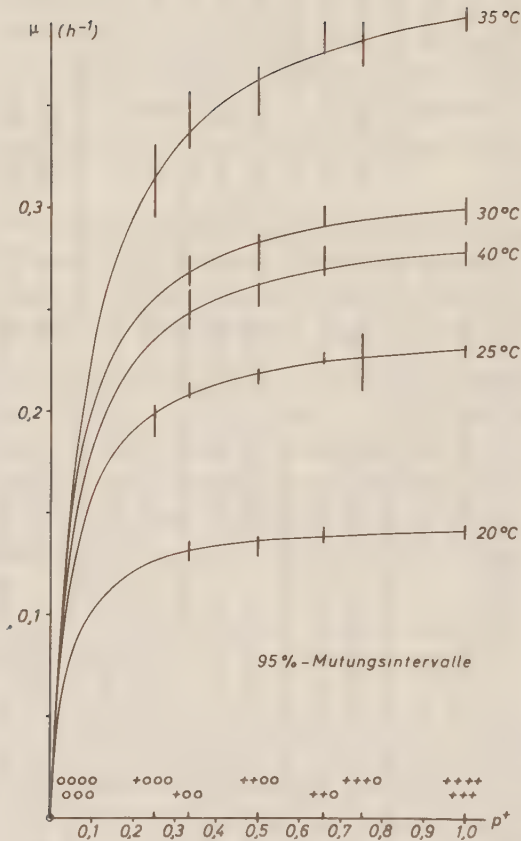


Abb. 11: Die Wachstumsgeschwindigkeit μ als Funktion der Gendosis p^+ im $\square + o \square$ -System bei verschiedenen Temperaturen.

Wird die Wachstumsgeschwindigkeit μ in Form der 95 %-Mutungsintervalle als Funktion der Gendosis p^+ [Anzahl der +-Allele / Ploidiegrad] graphisch dargestellt, erhält man für die einzelnen Temperaturen die in Abb. 11 wiedergegebenen Kurven, die in ihrem Verlauf an die LANGMUIR'schen Isothermen für die Adsorption von Gasen an

Oberflächen bzw. die aus der Enzymkinetik bekannten Aktivitätskurven in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erinnern³⁰.

Während die homozygoten, temperatur u n abhängig Adenin-auxotrophen Tri- und Tetraplonten bei allen Temperaturen die Wachstumsgeschwindigkeit 0 aufweisen, genügt offensichtlich bereits e i n Wildtypallel in einem tetraploiden Genom [$p^+ = 0,25$], um eine Wachstumsgeschwindigkeit von 80 - 85 % des Wildtyps zu erreichen. Trotz dieses hohen Anstiegs der Wachstumsgeschwindigkeit für geringe p^+ -Dosen belegt besonders die 35° - Kurve deutlich, daß die Gendosiswirkungen nicht einem Alles-oder-Nichts-Gesetz, sondern einer funktionalen Abhängigkeit unterliegen.

Aus der Abb. 11 ist ferner zu ersehen, daß sich Gendosiseffekte am Temperaturoptimum [35° C] offensichtlich am stärksten ausprägen. Bei der tiefsten untersuchten Temperatur [20° C] reicht die Genauigkeit der verwendeten Methode nicht mehr aus, noch Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen den Gendosen $p^+ = 0,33$ und $p^+ = 1$ aufzulösen, während bereits bei 25° C ein sukzessiver Ersatz der o-Allele homozygot Adenin-auxotropher Stämme durch +- Allele einen signifikanten Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeiten mit sich bringt.

4.3. Das $\square + t \square$ -System

Obwohl sich die temperatur a b h ä n g i g Adenin-auxotrophen Tetraplonten [tttt] oberhalb von 30° C praktisch wie die [oooo]- bzw. [ooo]-Stämme verhalten [innerhalb einer Woche kein Aufwachsen bebrüteter Einzelzellen zu sichtbaren Kolonien], differieren im Gegensatz zum $\square + o \square$ -System alle durchgeführten Hybridenkombina-

30) Die in Abb. 11 eingezeichneten Kurvenzüge wurden nicht nach Augenmaß angepaßt, sondern nach einem in der Diskussion entwickelten mathematischen Modell, das auf molekular-biologischen Vorstellungen fußt, berechnet.

tionen aus Wildtyp- und ad_{2-1}^t -Allelen [s. Tabelle 5, S. 32 f.] bei allen Temperaturen [20° - 40° C] nicht signifikant von den homozygoten Wildtypstämmen [s. Tabelle 10 und Abb. 12].

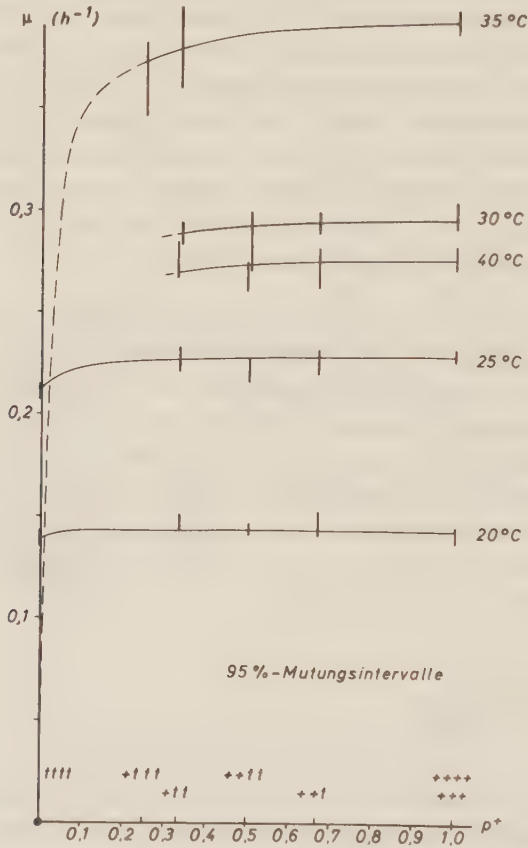


Abb. 12: Die Wachstumsgeschwindigkeit μ als Funktion der Gendosis p^+ im $+t$ -System bei verschiedenen Temperaturen.

Es reicht somit bereits ein $+-$ -Allel in einem tetraploiden Genom $[+ttt]$ aus, um das Wachstum der Hybriden auch bei Temperaturen, die die Vermehrung der $[tttt]$ -Homozygoten fast vollständig reduzieren³²,

32) s. S. 52 unten

Tabelle 10

T	Genotyp	tttt	tttt	ttt	tt	+++	++	+++	+++
[°C]	p ⁺	0	0,25	0,33	0,5	0,67	1		
20	g[h] μ[h ⁻¹]	4,99 (14) 0,139 (4)		4,72 (13) 0,147 (4)	4,81 (10) 0,144 (3)	4,74 (19) 0,146 ₅ (6)	4,91 (13) 0,141 (4)		
25	g[h] μ[h ⁻¹]	3,05 (8) 0,211 (4)		3,12 (9) 0,227 (6)	3,06 (8) 0,222 (6)	3,28 (12) 0,226 (6)	3,02 ₅ (4) 0,229 (3)		
28	g[h] μ[h ⁻¹]	5,67 (83) 0,122 (18)					2,32 (8 ₅) 0,298 (11)		
30	g[h] μ[h ⁻¹]			2,40 (4) 0,289 (5)	2,43 (12) 0,285 (14)	2,35 (5) 0,294 (5)	2,33 (5) 0,298 (6 ₅)		
35	g[h] μ[h ⁻¹]	~ 23 ³³⁾ ~ 0,030	1,90 (9) 0,364 (18)	1,83 (10) 0,380 (20)			1,77 (3) 0,392 (6)		
40	g[h] μ[h ⁻¹]			2,51 (8) 0,276 (9)	2,59 (7) 0,268 (7)	2,55 (9) 0,272 (10)	2,50 (6) 0,277 (6)		

33) Aus Abb. 14 extrapoliert

dem Wildtypniveau anzugleichen. Relativ zum $\square + \square$ -System scheint dieses System somit einen Kompensationsmechanismus zu besitzen, dessen Erörterung der Diskussion vorbehalten sei.

4.4. Das $\square$ to $\square$ -System

Die Untersuchung des Hybridensystems aus ad_{2-1}^t - und ad_{2-2}^o -Allelen [s. Tabelle 6, S. 33] bereitete wegen des häufigen Auftretens Adenin-prototropher somatischer Rekombinanten³⁴ die meisten Schwierigkeiten.

Um den Prototrophen-Titer möglichst niedrig zu halten, wurden die einzelnen Stämme - ehe sie zur Vorkultur ausgestrichen wurden - vom Schrägagar in $m/20 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ suspendiert und jeweils etwa 500 Zellen auf einer Petrischale mit "Testmedium" ausgespatelt. Nach zweitägiger Bebrütung wurden nur homogene rote Kolonien abgeimpft und für die Vorkultur verwandt.

Es zeigte sich jedoch, daß dieses Verfahren einen zu geringen Wirkungsgrad hatte, um auch bei höheren Temperaturen zu vernünftigen Meßergebnissen zu führen. Bis zu 25°C jedoch, dem Temperaturoptimum der [tttt]-Homozygoten, konnte wegen der relativ geringen Wachstumsunterschiede zwischen den somatischen und den Nicht-Rekombinanten zufriedenstellende Gendosiskurven erhalten werden [s. Tabelle 11, Abb. 13].

32) Die photometrische Messung der Wachstumsgeschwindigkeiten homozygot-temperaturabhängig Adenin-auxotropher Stämme ist inklusive der supprimierten Tri- und Tetraplonten bei Temperaturen über 30°C mit Schwierigkeiten verbunden, da der überstempelte, bei 25°C angezüchtete weiße Vorkulturrasen bei diesen Temperaturen mit der Zeit rot angefärbt wird, so daß die dadurch bedingte Absorption ein stärkeres Wachstum vortäuscht.

34) Aufspaltungsverhältnisse in 13 untersuchten Tetraden somatisch rekombinierter Diplonten: 50 % "weiße", 50 % "rote" Sporen.

Tabelle 11

T	Genotyp	oooo	tooo	too	ttoo	tto	ttto	tttt
[°C]	p^t	ooo						
		0	0,25	0,33	0,5	0,67	0,75	1
20	$g[h]$ $\mu[h^{-1}]$	∞		5,43 (20)	5,28 (24)	5,10 (17)		4,99 (14)
		0		0,128 (5)	0,131 (6)	0,136 (4 ₅)		0,139 (4)
25	$g[h]$ $\mu[h^{-1}]$	∞	4,49 (23)	4,14 (13)	3,65 (9)		3,41 (13)	3,28 (6)
		0	0,154 (8)	0,167 (5)	0,190 (5)		0,203 (8)	0,211 (4)

Die in Abb. 13 eingezeichneten 28° - und 35° -Kurven wurden aus der Wachstumsgeschwindigkeit der [tttt]-Homozygoten nach dem bereits erwähnten, in der Diskussion abgeleiteten Modell [s. S. 49, Fußnote 30] abgeschätzt.

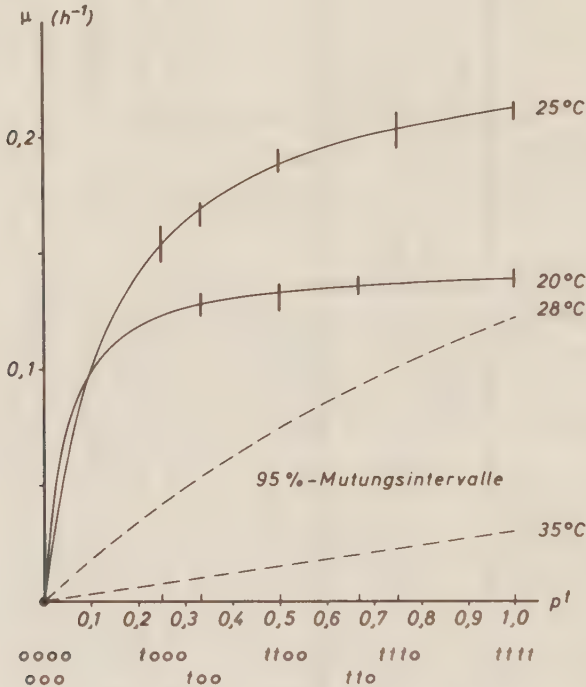


Abb. 13: Die Wachstumsgeschwindigkeit μ als Funktion der Gendosis p^t im $\square$ to $\square$ -System bei verschiedenen Temperaturen. Während die 20° - und 25° -Kurven experimentell bestimmt wurden, wurden die 28° - und 35° -Kurven abgeschätzt [s.Text].

Die gemessenen 20° - und 25° -Kurven [s. hierzu auch Fußnote 30, S. 49] weisen ein dem $\square$ +o $\square$ -System analogen Verlauf auf, wobei jedoch die Gendosiseffekte im $\square$ to $\square$ -System bei $25^{\circ}C$ ausgeprägter sind und die Wachstumsgeschwindigkeit der [tttt]-Homozygoten bei dieser Temperatur nur etwa 92 % des Wildtypniveaus beträgt, während sich die 20° -Kurven beider Systeme praktisch nicht von-

einander unterscheiden.

4.5. Das $\square$ ts $\square$ -System

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Stammsystemen, deren Gendosis-Kurven weitgehend dem LANGMUIR-Typ entsprechen, weisen die Kurven des Hybridensystems aus $su_1^- ad_{2-1}^t$ - und $su_1^+ ad_{2-1}^t$ -Allelen bei steter Homozygotie des ad_{2-1}^t -Allels [s. Tabelle 7, S. 33] ein stark abweichendes Verhalten auf [s. Tabelle 12, Abb. 14].

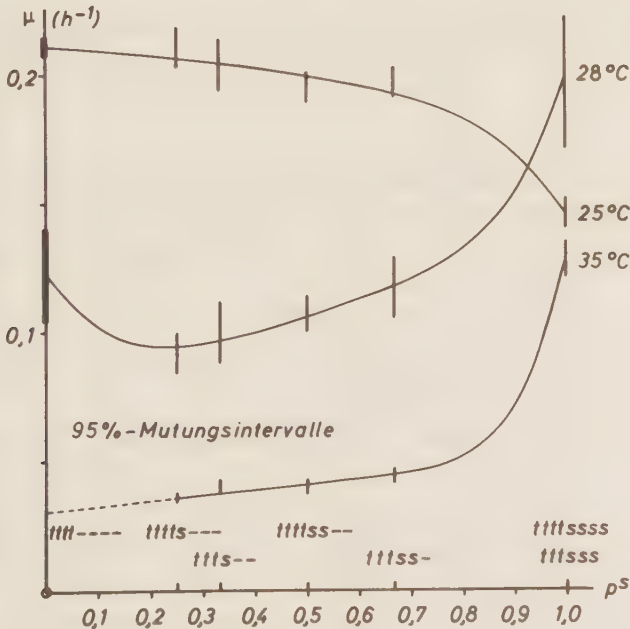


Abb. 14: Die Wachstumsgeschwindigkeit μ als Funktion der Gendosis p^S im $\square$ ts $\square$ -System bei verschiedenen Temperaturen.

Tabelle 12

T	Genotyp (bei steter Homozygotie der t-Allele)	----	s----	s---	ss--	ss-	ssss
[°C]	p ^s	0	0,25	0,33	0,5	0,67	1
25	g[h] μ[h ⁻¹]	3,28 (6) 0,211 (4)	3,28 (12) 0,211 (8)	3,40 (17) 0,204 (10)	3,56 (12) 0,195 (6)	3,52 (10) 0,197 (6)	4,75 (20) 0,146 (6)
28	g[h] μ[h ⁻¹]	5,67 (83) 0,122 (18)	7,52 (64) 0,092 (8)	6,92 (84) 0,100 (12)	6,50 (45) 0,107 (7)	5,95 (61) 0,117 (12)	3,52 (45) 0,197 (26)
35	g[h] μ[h ⁻¹]	~ 23 ³³⁾ ~ 0,030	19,2 (1,3) 0,036 (2)	17,5 (1,2) 0,040 (3)	17,4 (1,3) 0,040 (3)	15,8 (1,1) 0,044 (3)	5,41 (29) 0,128 (7)

33) Aus Abb. 14 extrapoliert

Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten bei den Gendosen $p^S = 0$ und $p^S = 1$ zeigt, daß der Suppressor bei 25°C einen wachstums hemmenden, bei 28° und 35°C jedoch einen wachstumsfördernden Einfluß ausübt. Die t-homozygoten Hybriden aus s^- - und s^+ -Allelen verhalten sich bei 25° und 35°C annähernd wie die [tttt----]-Homozygoten, bei 28°C scheint zumindest der [tttt s---]-Tetraplont eine noch geringere Wachstumsgeschwindigkeit als der [tttt----]-Stamm zu besitzen, so daß eine leicht durchhängende Kurve resultiert. Obwohl ein derartiger Kurvenverlauf zunächst zweifelhaft erscheint, gibt es Argumente, die seine Evidenz stützen [s. S. 86].

4.6. Ein Vergleich der Temperaturoptima der verwendeten [bis auf den Paarungstyp-Locus] homozygoten Stämme

Trägt man die Wachstumsgeschwindigkeiten der jeweiligen homozygoten Tri- und Tetraplonten gegen die Temperatur auf, erhält man die in Abb. 15 wiedergegebene Darstellung.

Das T e m p e r a t u r o p t i m u m liegt

für die Wildtyp - Homozygoten bei 35°C mit $\mu = 0,392 \text{ h}^{-1}$
bzw. $g = 1,77 \text{ h}$,

für die [tttt] - Homozygoten bei 25°C mit $\mu = 0,211 \text{ h}^{-1}$
bzw. $g = 3,05 \text{ h}$ und

für die [ttttssss]-Homozygoten bei 28°C mit $\mu = 0,197 \text{ h}^{-1}$
[ttt sss] bzw. $g = 3,52 \text{ h}$.

Der sich nach der klassischen Terminologie rezessiv verhaltende Suppressor bewirkt also im homozygoten Zustand eine Verschiebung des Temperaturoptimums der temperaturabhängig Adenin-auxotrophen Homozygoten von 25° auf 28°C , wobei jedoch nicht die für die temperatursensiblen Stämme optimale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird. Andererseits ermöglicht diese suppressorbedingte Verschiebung des Temperaturoptimums den Zellen ein zwar reduzier-

tes, aber deutliches Wachstum auch bei Temperaturen über 30° C.

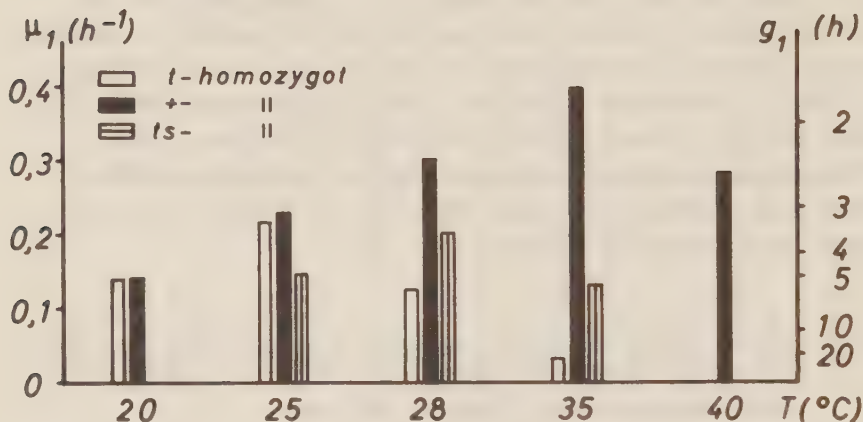


Abb. 15: Die Wachstumsgeschwindigkeit μ [bzw. Generationsdauer g] homozygoter Stämme in Abhängigkeit von der Temperatur.

4.7. Zusammenfassende Darstellung der Gendosiswirkungen in den verwendeten Stammsystemen

Zusammenfassend lassen sich die Gendosiswirkungen in den vier untersuchten Stammsystemen wie folgt charakterisieren [vergl. hierzu die Abb. 16 und 17]:

1. Ein sukzessiver Austausch der ad_2^+ -Allele homozygoter Wildtypstämme durch ad_{2-2}^0 -Allele führt zu einem sukzessiven Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit, wobei der Kurvenverlauf an die LANGMUIRSche Adsorptionsisotherme erinnert. Dieser Effekt scheint im optimalen Temperaturbereich ausgeprägter als im suboptimalen zu sein.

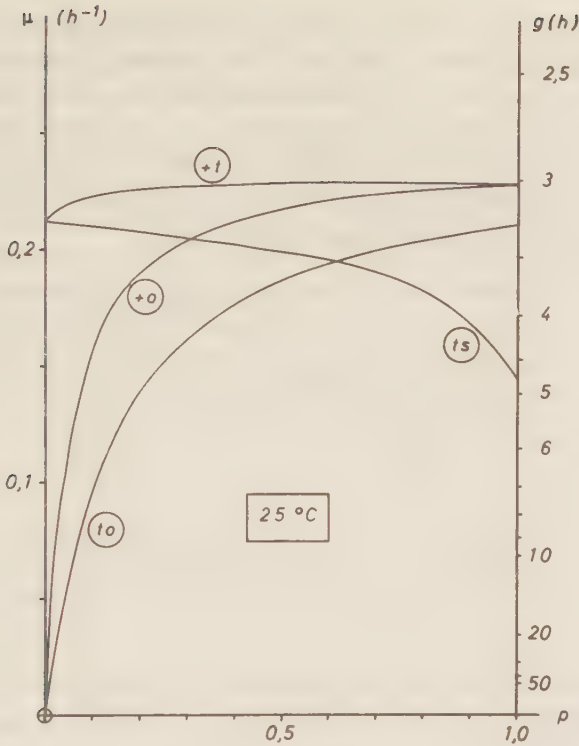


Abb. 16: Zusammenfassende Darstellung der 25^o-Gendosiskurven der vier verwendeten Stammsysteme.

2. Werden statt der ad_{2-2}^o -Allele ad_{2-1}^t -Allele in homozygote Wildtypstämme eingeführt, zeigen die Hybriden bis hinunter zu $p^+ = 0,25$ keinen signifikanten Unterschied zum Wildtypwachstum, obwohl sich die temperatursensiblen Homozygoten bei Temperaturen über 30^o C annähernd wie die [oooo]- bzw. [ooo]-Stämme verhalten.
3. Die 25^o-Gendosiskurve des $\square \text{ to } \square$ -Systems erinnert an die 25^o-Kurve des $\square \text{ +o } \square$ -Systems, jedoch entspricht die Wachstumsgeschwindigkeit für $p^t = 1$ nur etwa 92 % der für $p^+ = 1$ gemessenen. Außerdem sind die Gendosiswirkungen ausgeprägter.

4. Werden $su_1^+ad_{2-1}^t$ -Allele in homozygot-temperatursensible Stämme eingekreuzt, kommt es bei 25° C und höheren p^s -Dosen zu einem sukzessiven Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit, während bei 35° C in demselben Gendosisbereich ein zunehmend sich verstärkendes Wachstum zu beobachten ist. Bei 28° C scheint die Wachstumsgeschwindigkeit als Funktion der Gendosis p^s einer durchhängenden Kurve zu folgen [s. Abb. 14].

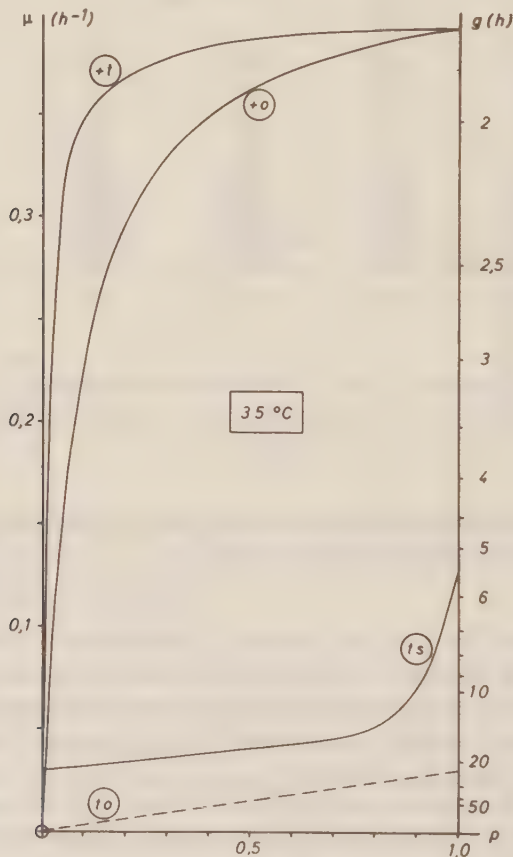


Abb. 17: Zusammenfassende Darstellung der 35°-Gendosiskurven der vier verwendeten Stammsysteme.

Ein die Gendosiswirkungen in den untersuchten Systemen befriedigend beschreibendes Modell muß alle angeführten Effekte erklären können.

5 . D I S K U S S I O N

Ehe die im vorigen Kapitel besprochenen experimentellen Befunde im einzelnen diskutiert und interpretiert werden, seien in aller Kürze die heutigen Vorstellungen zur Informationsübertragung vom Gen zum Protein und damit in vielen Fällen zum Phän umrissen. Um den Rahmen einer kurzen Übersicht nicht zu sprengen, wird auf das Zitieren der vielen Originalarbeiten, die zu diesen Erkenntnissen geführt haben, weitgehend verzichtet, stattdessen werden an einigen Stellen zusammenfassende Darstellungen [durch * vor dem Autorennamen gekennzeichnet] angegeben.

5.1. Kurzer Abriß über die heutigen Vorstellungen zur Proteinbiosynthese

Nach dem heutigen Stand der molekularen Biologie [*BRESCH 1964, *WATSON 1965, *TAYLOR (Herausgeber) 1963, 1967, (*)MATTHAEI et al. 1968] ist die genetische Information für die von einer Zelle produzierbaren Proteine in der Sequenz der vier Nukleotide Desoxyadenosin-5'-phosphat [A'], Desoxyguanosin-5'-phosphat [G'], Desoxythymidin-5'-phosphat [T'] und Desoxycytidin-5'-phosphat [C'] der doppelhelicalen Desoxyribonukleinsäure [DNS] manifestiert, wobei jeweils A' und T' bzw. G' und C' komplementär zueinander sind, - und zwar codiert jeweils ein Nukleotid-Triplett eine Aminosäure des betreffenden Proteins.

Von den 64 möglichen Triplets konnten 61 den 20 als Proteinbausteinen verwendeten Aminosäuren zugeordnet werden [*SPEYER 1967], drei³⁵ erwiesen sich als Unsinn-Codone, denen normalerweise keine

35) In Form der gewöhnlich angegebenen mRNS-Triplets sind dies: UAG (= Amber), UAA (= Ochre), UGA, wobei die nicht-apostrophierten Buchstaben R i b o nukleotide symbolisieren.
Forts. S. 62 unten.

Aminosäuren entsprechen und die als "Interpunktionszeichen" [Terminationscodone]³⁶ aufzufassen sind.

Mit dem codogenen DNS-Strang als Matrize wird die messenger-Ribonukleinsäure [mRNS] gen- oder polycistronweise synthetisiert und somit die Information von der hochmolekularen DNS auf die geringer molekulare mRNS übertragen [Transkription]. Statt der Desoxyribose wird in Ribonukleinsäuren Ribose, statt der Base Thymin Uracil [das entsprechende Ribonukleotid wird mit U abgekürzt] eingebaut.

Die mRNS geht eine lockere Verbindung mit den Ribosomen des Cytoplasmas ein [näheres hierzu s. MATTHAEI et al. 1968], an denen die Information der mRNS von transfer-RNS [tRNS]-Molekeln abgelesen wird. Hierbei entspricht mit Ausnahme der Unsinn-Codone jedem messenger-Triplett eine (oder mehrere) spezifische Aminoacyl-tRNS, die ein zu dem messenger-Triplett komplementäres Anticodon und eine normalerweise eindeutig zugeordnete Aminosäure [AS] besitzt³⁷. Der hier beschriebene Vorgang wird als Translation bezeichnet.

Die Aminosäuren werden unter Energieverbrauch (GTP) zu einer Polypeptidkette verknüpft und lösen sich von ihrer tRNS, die wiederum den mRNS-Strang verläßt. Bestimmte der auf diese Weise hergestellten Polypeptidketten können entweder als Monomere oder unter Aggregation zu Multimeren einen spezifischen Schritt $X \longrightarrow Y$ einer Reaktionskette im Zellmetabolismus katalysieren [Enzyme].

-
- 35) Forts.: Während UAA, UAG und UGA offensichtlich die normalen Stoppsignale der Zelle darstellen [Ende einer Polypeptidkette], bewirken "absolut unsinnige" Codons, wie z.B. Xanthinhaltige Triplettts, keine Termination [BRETSCHER et al. 1965].
- 36) Neben den Terminationscodonen sind auch Startsignale bekannt [AUG, GUG, GUA?], die von einer spezifischen tRNS [N-Formylmethionyl-tRNA_F] abgelesen werden. Zum Mechanismus s. *LENGYEL 1967.
- 37) Die Verbindung der einzelnen Aminosäuren mit ihren spezifischen tRNS-Molekülen erfolgt endergonisch mit Hilfe eines spezifischen "aktivierenden Enzyms", das die zusammengehörenden tRNS-Arten und Aminosäuren erkennen muß. Der Mechanismus ist noch ungeklärt.

Der gesamte Vorgang kann nach dem Modell von JACOB u. MONOD (1961) dadurch reguliert werden, daß ein ganz bestimmtes in der metabolischen Reaktionskette auftauchendes Molekül [Effektor] zusammen mit einem von einem Regulatorgen produzierten Repressor in die Operatorregion eines oder mehrerer Strukturgene [Operon] eingreift und auf diese Weise entweder die Synthese der entsprechenden mRNA initiiert oder blockiert.

Schematisch läßt sich die Informationsübertragung vom Strukturgen zum Enzym folgendermaßen zusammenfassen:

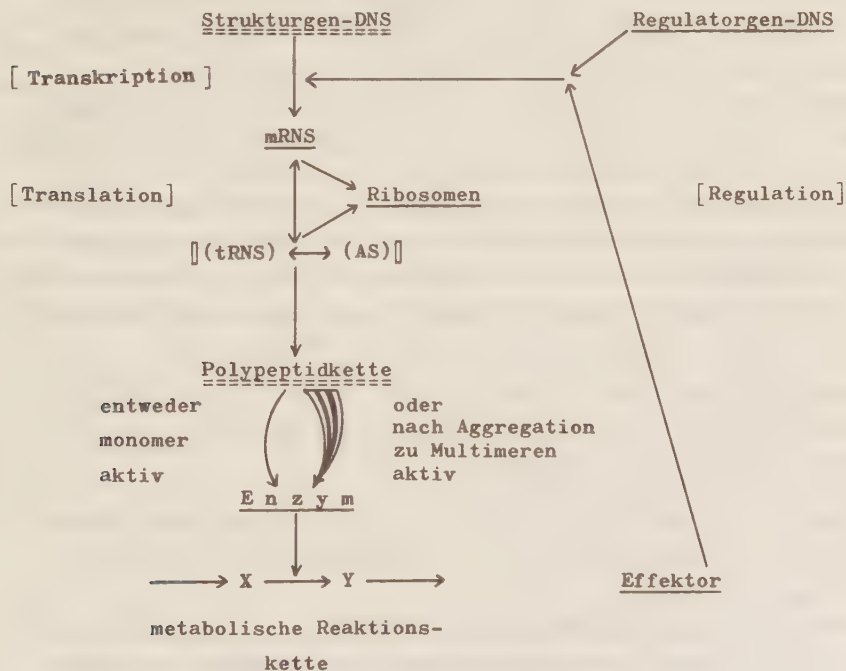


Abb. 18: Schematische Darstellung der funktionellen Beziehung zwischen DNS (Gen) und Enzym (→ Phän).

Veränderungen des Erbgutes werden in GENOM- [Polyploidien, Aneuploidien], CHROMOSOMEN- [Deletionen, Duplikationen, Inversionen von Chromosomenabschnitten] und GEN- oder PUNKTMUTATIONEN eingeteilt.

Eine G e n m u t a t i o n kann a) auf dem Austausch oder b) auf der Addition bzw. Deletion eines, unter Umständen auch mehrerer Nukleotide im DNS-Strang beruhen, wodurch das von dem entsprechenden Gen codierte Enzym häufig seine Aktivität verliert und die metabolische Reaktionskette unterbrochen wird.

Der A u s t a u s c h eines Nukleotids [z.B. durch Transition $A' \leftrightarrow G'$ bzw. $T' \leftrightarrow C'$] führt häufig, wegen der Degeneration des genetischen Codes jedoch nicht immer, zum Einbau einer falschen Aminosäure [F e h l s i n n - M u t a t i o n] in das zugehörige Polypeptid, braucht aber nicht vollständig enzyminaktivierend zu wirken. Bei Abänderung eines Triplets zu einem U n s i n n - Codon erfolgt Abbruch der Polypeptidkette [s. zu diesem Fragenkomplex beispielsweise BENZER u. CHAMPE 1962, WEIGERT u. GAREN 1965, BRENNER et al. 1965, SARABHAI et al. 1964]. Das resultierende Peptidfragment besitzt gewöhnlich keine enzymatische Aktivität.

Die D e l e t i o n oder A d d i t i o n eines Nukleotids bedingt eine Phasenverschiebung der Codon-Triplets und damit eine Abänderung der AS-Sequenz des Polypeptids, dürfte also praktisch immer enzyminaktivierend wirken.

Durch S e k u n d ä r m u t a t i o n kann es zur Restauration des von der Primärmutation gesetzten Schadens kommen [S u p p r e s s i o n] .

Man unterscheidet im wesentlichen zwischen i n t r a g e n i - s c h e r [echte Rückmutation, gegenseitige Aufhebung von Rasterverschiebungen (Plus-Minus-Situation), doppelter Aminosäureübergang (durch eine weitere Mutation am gleichen Triplett wird eine andere, vom Wildtyp verschiedene Aminosäure eingebaut, die im Gegensatz zur AS der Erstmutation nicht inaktivierend wirkt, s. z.B. HENNING u. YANOFSKY 1962, HELINSKI u. YANOFSKY 1963)] und i n t e r g e n i s c h e r S u p p r e s s i o n .

I n t e r g e n i s c h läßt sich der primärmutative Schaden entweder locus- oder allelspezifisch kompensieren.

Nach den Untersuchungen von LEIN u. LEIN 1952, HOWARTH 1958 und KAKAR 1963 kann beispielsweise der durch die Erstmutation blockierte Reaktionsschritt über das sekundärmutativ bedingte Öffnen eines zweiten Syntheseweges l o c u s s p e z i f i s c h umgangen werden.

Die a l l e l s p e z i f i s c h e i n t e r g e n i s c h e S u p p r e s s i o n (Suppression i.e.S.) dürfte nach den heutigen Vorstellungen auf dem Niveau der Translation [s. hierzu z.B. YANOFSKY u. St.LAWRENCE 1960, BENZER u. CHAMPE 1962, BRODY u. YANOFSKY 1963, WEIGERT u. GAREN 1965, 1965*, BRENNER et al. 1965, STRETTON u. BRENNER 1965, WEIGERT et al. 1965, GAREN et al. 1965, GALUCCI u. GAREN 1966]³⁸, und zwar vornehmlich über die Spezifitätsänderung irgendeiner tRNS erfolgen³⁹.

Führte die Primärmutation zur Bildung eines Unsinnscodons und damit zum vorzeitigen Kettenabbruch eines Polypeptids, so kann durch (sekundär-) mutative Änderung des Anticodons einer tRNS [der aufgrund ihrer übrigen spezifischen Eigenschaften (sterische Konformation o.ä.) weiterhin die ursprüngliche Aminosäure AS* zugeord-

- 38) In der Hefegenetik werden Suppressoren, die zwar allelspezifisch, jedoch mehrere Gene beeinflussend wirken, als Supersuppressoren bezeichnet [s. hierzu HAWTHORNE u. MORTIMER 1963, MANNEY 1964, MAGNI et al. 1966, GILMORE u. MORTIMER 1966, GILMORE 1967, BARBEN 1966].
- 39) Eine Suppression über die Spezifitätsänderung eines aktivierenden Enzyms [Aminoacyl-tRNS-Synthetase] würde die Existenz spezieller Terminations-tRNS-Molekeln (mit Terminations-Anticodons) voraussetzen. Die Untersuchungen von CAPECCHI 1967 und SÖLL 1968 deuten jedoch darauf hin, daß es keine derartigen tRNS-Arten gibt.

Weitere Möglichkeiten der Suppression auf dem Niveau der Translation [Änderung der Ribosomen u.ä.] s. z.B. *GORINI u. BECKWITH 1966.

net wird] zu einem Terminations-Anticodon die "Fehlstelle" der mRNS-Anweisung durch Einbau von AS* in die Polypeptidkette überbrückt werden.

Bei einem Wirkungsgrad von 100 % würde sich eine derartige Suppressormutation mit ziemlicher Sicherheit als letal für die betroffenen Zellen erweisen, da an all den Stellen, wo natürlichlicherweise ein von dem entsprechenden Unsinn-Triplett codierter Kettenabbruch erfolgen sollte, zwei oder mehrere Polypeptidketten durch AS* verknüpft würden, so daß keine funktionsfähigen Enzyme gebildet werden könnten. Es zeigte sich jedoch, daß (bei Bakteriophagen und *E. coli*) in vivo UAG [KAPLAN et al. 1965] und UGA [SAMBROOK et al. 1967] maximal bis zu 63 %, UAA [GALUCCI u. GAREN 1966] nur bis zu 6 % supprimiert werden. Nach MATTHAEI et al. (1968) könnte diese unterschiedliche Suppression der Unsinn-Triplets auf eine Kompetition zwischen Suppressor-tRNS und R-Faktor [für die aktive Termination verantwortlicher proteinoider "Release"-Faktor (CAPECCHI 1967) mit unterschiedlichen Affinitäten zu den drei Unsinn-codons (UAA $\gg$ UAG, UGA), der die Funktion der bisher vermuteten Terminations-tRNS besitzen dürfte (s. auch Fußnote 39, S. 65)] zurückzuführen sein.

Ein zur Suppression von Unsinn-Mutationen analoger Mechanismus ist auch für die Kompensation von Fehlsinnmutationen anzunehmen; so konnten BRODY u. YANOFSKY 1963 nachweisen, daß aufgrund einer Primärmutation Arginin statt Glycin an einer bestimmten Stelle des A-Proteins der Tryptophansynthetase von *Escherichia coli* eingebaut wurde. Eine ungekoppelte Suppressor-Mutation führte jedoch wieder zu einer teilweisen Inkorporation von Glycin⁴⁰.

Eine Erklärung der im 4. Kapitel skizzierten Gendosisabhängigkeiten sei in dem hier abgesteckten Rahmen gesucht.

40) Bei der Suppressor-spezifischen Aminosäure braucht es sich natürlich nicht immer um die "Wildtyp"-AS zu handeln.

5.2. Diskussion der Mutationsereignisse

Unter dem Einfluß des 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-Guanidins, dessen mutagene Wirkung neben der Desaminierung des Adenins vor allem der Methylierung des Guanins und anderer DNS-Basen zugeschrieben wird [s. S. 9], ist es in dem Wildtyp-Haplonten 1000 offensichtlich zu jeweils einem Nukleotidaustausch an zwei differenten Stellen des ad_2 -Locus gekommen. Die beiden mutierten Allele wurden als ad_{2-1}^t (kurz: t) und ad_{2-2}^o (kurz: o) bezeichnet. Die nähere Untersuchung ergab, daß

1. Zellen mit homozygoter t-Konfiguration bis zu Temperaturen um 25° C recht gut wachsen können, darüber hinaus in ihrer Vermehrungsfähigkeit jedoch so stark eingeschränkt sind, daß Einzelzellen auf Minimalmedium bei 35° C, dem Temperaturoptimum homozygoter Wildtyp-Stämme, innerhalb einer Woche nicht mehr zu sichtbaren Kolonien aufwachsen,
2. Zellen mit homozygoter o-Konfiguration in dem geprüften Temperaturbereich von 20° bis 40° C auf Minimalmedium überhaupt nicht vermehrungsfähig sind,
3. Hybriden aus t- und o-Allelen häufig zu spontaner somatischer Rekombination neigen.

Analog den osmotisch revertierbaren Mangelmutanten von HAWTHORNE und FRIIS (1964) kann das Auftreten von temperatursensiblen Auxotrophen am einleuchtendsten über die mutativ bedingte Substitution einer strukturell bedeutsamen Aminosäure in der von dem betroffenen Gen codierten Polypeptidkette gedeutet werden. Befindet sich diese Aminosäure z.B. an einer bestimmten "Spannungen" ausgesetzten Stelle, die für die Bindung zweier Untereinheiten verantwortlich ist (Aggregations-Site) oder eine spezifische, für die katalytische Aktivität essentielle Faltung hervorruft, so ist es denkbar, daß die aufgrund der Primärmutation inserierte falsche Aminosäure zwar bei tieferen, wegen der stärkeren innermolekularen Schwingungen jedoch nicht bei höheren Temperaturen die notwendige Bindung aufrecht zu erhalten vermag.

Durch die spontan aufgetretene allel-, nicht jedoch locusspezifische Suppressor-Mutation⁴¹ könnte nun mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit⁴² eine dritte Aminosäure an der betreffenden Stelle eingebaut werden, die aufgrund ihrer sterischen Konformation eine Reduktion der primärmutativ verursachten Thermolabilität des geschädigten Enzyms bedingt und somit zu einer Verschiebung des Vermehrungsoptimums supprimierter temperatursensibler Stämme zu höheren Temperaturen führt.

41) Wie auf S. 15 erwähnt wurde, supprimiert $su_1^+ ad_{2-1}^t$ allein die ad_{2-1}^t -Mutante, nicht jedoch ad_{2-2}^o . Andererseits kann natürlich eine Suppression weiterer, nicht untersuchter Mutationen des ad_2 -Gens oder anderer Cistrons nicht ausgeschlossen werden.

42) Ist durch die Sekundärmutation das Anticodon einer $trNS_1$, die spezifisch AS_1 , eine der 20 Aminosäuren bindet [$trNS_1-AS_1$], verändert worden, so wird diese Suppressor- $trNS_1^*$, die weiterhin AS_1 ankoppelt, mit einer $trNS_2$, der natürlicherweise das $trNS_1^*$ -Anticodon zukommt [$trNS_2-AS_2$], um das komplementäre messenger-Codon konkurrieren. Die Wahrscheinlichkeit für den Einbau von AS_1 bzw. AS_2 an der betreffenden Stelle dürfte somit von dem Konzentrationsverhältnis zwischen $trNS_1^*-AS_1$ und $trNS_2-AS_2$ abhängig sein.

Gäbe es nur einen $trNS_1$ -codierenden DNS-Locus, so wäre nach der Mutation zu $trNS_1^*$ in der Zelle keine das $trNS_1$ -Anticodon enthaltende $trNS$ mehr vorhanden [abgesehen von dem prämutativen Rest, der während der Vermehrung der Zellen schnell herausverdünnt werden bzw. mit der Zeit denaturieren dürfte]. Die Isolation zweier, in ihrer Nukleotidsequenz geringfügig differierender Serin- $trNS$ -Arten mit dem gleichen Anticodon aus Hefe [ZACHAU et al. 1966] weist jedoch darauf hin, daß bestimmte "synonyme" $trNS$ -Sorten von zwei oder mehreren Loci codiert werden können, so daß die Bildung von $trNS_1$ auch nach Mutation eines dieser Loci zu $trNS_1^*$ gewährleistet erscheint.

Die Existenz mehrerer "synonymer" $trNS$ -Arten kann auch zur Erklärung des unterschiedlichen, von der Einbauwahrscheinlichkeit der suppressorspezifischen Aminosäure abhängigen Wirkungsgrades verschiedener Suppressor-Mutationen herangezogen werden.

Auf dieser Basis erscheint daher die Hypothese gerechtfertigt, die Mutation zum ad_{2-1}^t -Allel als F e h l s i n n m u t a t i o n zu klassifizieren.

Das Verhalten der ad_{2-2}^o -Mutante kann mit gleicher Berechtigung als Folge einer Unsinn- (Terminationscodon) als auch einer Fehlsinnsmutation gewertet werden. Die Unsinnmutation würde ein katalytisch inaktives Peptidfragment, die Fehlsinnsmutation ein zwar vollständiges, jedoch "vollkommen" aberrant gefaltetes bzw. aggregationsunfähiges Polypeptid liefern. Eine Entscheidung ist mit Hilfe der vorliegenden Befunde nicht möglich.

Die relativ hohe somatische Rekombinationsrate zwischen ad_{2-1}^t und ad_{2-2}^o deutet darauf hin, daß die beiden Mutationsorte ziemlich weit voneinander entfernt liegen.

5.3. Entwicklung und Diskussion eines quantitativen Modells zur Beschreibung der Gendosisabhängigkeit von Wachstumsgeschwindigkeiten - unter der Voraussetzung, daß das betrachtete Gen ein monomer aktives Enzym codiert.

Wie in Kapitel 5.1. ausgeführt wurde, codieren bestimmte Strukturgene jeweils ein ihnen eindeutig zugeordnetes Enzym, das gewöhnlich einen ganz spezifischen Reaktionsschritt $X \longrightarrow Y$ im Zellmetabolismus zu katalysieren vermag. [So dürfte wahrscheinlich der ad_2 -Locus die genetische Information für die den Schritt vom CAIR zum SAICAR katalysierende SAICAR-Synthetase (s. S. 4 f.) enthalten.]

Nimmt man nun an, daß jedes dieser Gene für sich während der l o g - a r i t h m i s c h e n W a c h s t u m s p h a s e eine konstante allelspezifische Enzymaktivität pro Zeiteinheit liefert⁴³

43) s. S. 70 unten

und ordnet man jedem Allel des betrachteten Gens die allelspezifischen Enzymaktivitäten a_+ für den Wildtyp und $a_1, a_2, \dots, a_z$ für die verschiedenen mutierten Allele zu, so resultiert unter der Voraussetzung, daß zwischen den einzelnen allelspezifischen, monomeren aktiven Enzymmolekeln keine Wechselwirkungen bestehen, pro Zeiteinheit und haploides Genom eine Gesamtaktivität A von

$$(5) \quad A = \frac{(n_+/P) \cdot a_+ + \sum_{i=1}^{i=z} (n_i/P) \cdot a_i}{1}$$

mit der Anzahl n der jeweiligen Allele und dem Ploidiegrad⁴⁴ P.

Unter Verwendung der Gendosis $p^+ = n_+/P$ bzw. $p^i = n_i/P$ ⁴⁵ und der relativen, auf den Wildtyp bezogenen allelspezifischen Enzymaktivität $\alpha_i = a_i/a_+$ läßt sich Gl. (5) in

$$(6) \quad A = a_+ \cdot \left[p^+ + \sum_{i=1}^{i=z} \alpha_i p^i \right]$$

umformen.

Diesem A kann nach der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik [s. z.B. DIXON u. WEBB 1966] die Konzentration y des in der Reaktionskette $X \longrightarrow Y$ gebildeten Produktes Y bei genügend hohen Konzentrationen x des

43) Man kann davon ausgehen, daß während der log-Phase irgendein Zellbestandteil z_i - von außen gesehen - dem gleichen exponentiellen Wachstumsgesetz unterworfen ist wie die Population selbst [$\dot{N}/N = \dot{z}_i/z_i = \mu$], daß sich also an den Konzentrationen von z_i in den einzelnen Zellen während dieser Zeit statistisch nichts ändert [steady state].

44) Eine Ineinanderschachtelung verschiedener Ploidiegrade scheint nach den Erörterungen auf S.43f. erlaubt.

45) i ist hier ein hochgestellter Index, kein Exponent !

Substrates X als proportional gelten⁴⁶:

$$(7) \quad \underline{y = k \cdot A}$$

mit einer Proportionalitätskonstanten k.

Für $A < a_+$ [$A = a_+$, wenn $p^+ = 1$ und $p^i = 0$ (Wildtyp)] dürfte somit Y als wachstumsbegrenzender Faktor in der Zelle wirken.

Nun konnte MONOD 1942 folgenden empirischen, inzwischen experimentell gut untermauerten Zusammenhang [s. z.B. FENCL 1966] zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit μ und der Konzentration s eines wachstumsbegrenzenden "Nährstoffes" S im Medium angeben:

$$(8) \quad \underline{\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot s}{K + s}},$$

wobei $\mu_{\max}$ die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [$s \rightarrow \infty$ unter der Voraussetzung, daß keine Substrathemmung auftritt] und K eine der MICHAELIS-Konstanten analoge "Sättigungskonstante" ist.

Bezüglich dieser Gleichung dürfte es nun irrelevant sein, ob ein von außen zugeführter (S) oder intrazellulär gebildeter "Nährstoff" (Y) betrachtet wird, so daß man in (8) s durch y ersetzen kann.

Mit der Bedingung, daß für $p^+ = 1$ [$A = a_+$, $p^i = 0$] $\mu = \mu_1$ (Wachstumsgeschwindigkeit der homozygoten Wildtypen) sein soll, und Einführung einer neuen Konstanten $\gamma = K/(a_+ \cdot k)$ folgt aus (6), (7) und (8)

46) Die Voraussetzung genügend hoher Substratkonzentration dürfte zumindest für $A < a_+$ erfüllt sein, da wegen der "Wildtyp - funktion" der übrigen Enzyme in der Zelle unter dieser Bedingung mehr X angeliefert wird als verarbeitet werden kann. [Bei den gesamten, hier durchgeführten Betrachtungen werden Regulationsvorgänge ausgeklammert.]

$$(9) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot [p^+ + \sum_{i=1}^n \alpha_i p^i]}{\gamma + [p^+ + \sum_{i=1}^n \alpha_i p^i]}$$

=====

mit $\mu_1 = \mu_{\max} / (1+\gamma)^{47}$.

Dieser theoretische Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Gendosis sei nun einer Prüfung durch die experimentell ermittelten Gendosisabhängigkeiten unterworfen.

Für das $\square + o \square$ - System vereinfacht sich (9) mit $\alpha_o = 0$ [das ad_{2-2}^o -Allel liefert kein funktionsfähiges Enzym] zu

$$(10) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot p^+}{[\gamma + p^+]}$$

Durch Umformung läßt sich (10) in eine für die Auswertung der experimentellen Daten gut geeignete Gleichung überführen:

$$(11) \quad \frac{p^+}{\mu} = \frac{[\gamma / (1+\gamma) \cdot \mu_1] + [p^+ / (1+\gamma) \cdot \mu_1]}{1}$$

Trägt man somit p^+/μ gegen p^+ auf, erhält man eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der negativen Abszisse den Betrag der Konstanten γ liefert.

47) Eine strenge Gültigkeit dieser Beziehung würde fordern, daß Gendosen $p^+ > 1$, die z.B. durch Genduplikationen erreicht werden könnten, eine Steigerung von μ über die Wachstumsgeschwindigkeit homozygoter Wildtypen hinaus verursachen sollten. Wegen des geringen Betrages von γ [$\sim 0,06$, s. die folgenden Seiten] wäre eine experimentelle Absicherung dieses Effektes [$\mu_{\max} = 1,06 \cdot \mu_1$] nur schwer möglich. Andererseits muß bedacht werden, daß unter derartigen Bedingungen die Voraussetzung genügend hoher Substratkonzentrationen x [s. Fußnote 46, S. 71] nicht mehr erfüllt sein dürfte und irgendein anderer Reaktionsschritt als limitierendes Glied der metabolischen Kette wir- (Forts. S. 73 unten)

Analog der MICHAELIS-Konstanten gibt einem der Wert von γ hier die Gendosis an, die zu einer halbmaximalen Wachstumsgeschwindigkeit $[\mu_{\max}/2]$ führen würde. Bei $\gamma = 0,06$ reicht somit bereits ein Wildtypallel unter 15 o-Allelen in einem hypothetischen Polyplonten vom Ploidiegrad 16 aus, um den Zellen eine halbmaximale Wachstumsgeschwindigkeit [53 % der Geschwindigkeit homozygoter Wildtyptri- bzw. -tetraplonten, s. hierzu auch Fußnote 47] zu ermöglichen.

Abb. 19 A zeigt die Ergebnisse der Gendosisuntersuchungen für das $\square + o \square$ -System im $p^+/\mu - p^+$ -Diagramm. Wie aus der Abbildung hervorgeht, dürfte das hier abgeleitete Modell die experimentellen Befunde dieses Systems befriedigend wiedergeben. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse geprüft⁴⁸.

Aus der Regressionsanalyse resultieren in Abhängigkeit von der Temperatur folgende Werte für γ und μ_1 [vergl. auch Abb. 19 B]:

Tabelle 13

T [°C]	γ	$\mu_1 [h^{-1}]$	$\gamma/\mu_1 [h]$
20	0,0435	0,1409	0,3087
25	0,0536	0,2297	0,2333
28	0,0833	0,3034	0,2746
30	0,0604	0,2993	0,2018
35	0,0886	0,3926	0,2257
40	0,0624	0,2776	0,2248
Mittelwert:			0,24

47) Forts.: -ken könnte, so daß Gl. (9) nur als Näherung, die die Gendosisabhängigkeiten für $p^+ \leq 1$ befriedigend beschreibt [s. $\square + o \square$ - und $\square to \square$ -System], betrachtet werden kann.

48) s. S. 74 unten

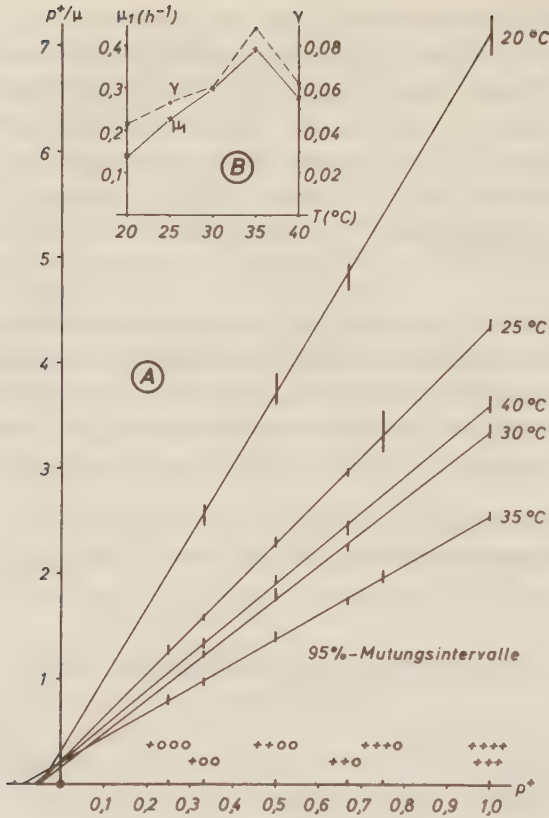


Abb. 19A: Die Ergebnisse des $\square + o \square$ -Systems im $p^*/\mu - p^+$ -Diagramm.

Abb. 19B: Temperaturabhängigkeit von γ und μ_1 .

- 48) Nach Substitution von $1/\mu$ durch g gemäß Gl. (3) [S. 36] in Gl. (11) wurde die Regression von g auf $1/p^+$ nach $g = a + b \cdot \frac{1}{p^+}$ mit $a = g_1/(1+\gamma)$ und $b = \gamma \cdot g_1/(1+\gamma)$ geprüft. In allen Fällen erwies sich in dem untersuchten Bereich die Übereinstimmung zwischen Modell und Meßergebnissen als signifikant [F-Test auf dem 5%-Niveau für die Linearität der Regressionsgraden]. Die beiden Konstanten errechnen sich nach $\gamma = b/a$ und $\mu_1 = (\ln 2)/(a+b)$.

Vergleicht man nun die in Tabelle 13 wiedergegebenen Daten [s. auch Abb. 19 B], so scheinen μ_1 und γ zumindest in erster Näherung dem gleichen Temperaturgesetz zu folgen [annähernde Konstanz von γ/μ_1 , Mittelwert: $\gamma/\mu_1 \approx 0,24 \text{ h}$]. Damit wird die bereits auf S. 49 ausgesprochene Vermutung, daß sich unter Temperaturbedingungen, die für die Zellvermehrung optimal sind, Substitutionen der +-Allele durch o-Allele offensichtlich gravierender als im suboptimalen Bereich bemerkbar machen, quantitativ untermauert.

Für das $\square \text{ to } \square$ - System vereinfacht sich Gl. (9) wegen $p^+ = 0$, $\alpha_o = 0$ mit p^t und α_t zu

$$(12a) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot \alpha_t p^t}{[\gamma + \alpha_t p^t]} \quad \text{bzw.}$$

$$(12b) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot p^t}{[(\gamma/\alpha_t) + p^t]},$$

wobei μ_1 die Wachstumsgeschwindigkeit homozygoter Wildtyptri- und -tetraplonten und γ die Konstante des $\square \text{ +o } \square$ -Systems ist.

Trägt man p^t/μ gegen p^t auf, erhält man analog dem $\square \text{ +o } \square$ -System eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der negativen Abszisse jedoch den Betrag von (γ/α_t) liefert.

Die Wachstumsgeschwindigkeit μ_1^t für die Gendosis $p^t = 1$ ergibt sich aus (12b) zu

$$(13) \quad \mu_1^t = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1}{[(\gamma/\alpha_t) + 1]}.$$

Sowohl aus dem Betrag von (γ/α_t) als auch aus Gl. (13) läßt sich bei Kenntnis von γ [und der relativen, auf die Wildtyp homozygoten bezogenen Wachstumsgeschwindigkeiten der (tttt)-Tetraplonten: $R = \mu_1^t/\mu_1$] die auf den Wildtyp bezogene relative t-Allel-spezifische Enzymaktivität α_t berechnen:

$$(14a) \quad \underline{\alpha_t = \gamma / (\gamma / \alpha_t)}$$

$$(14b) \quad \underline{\alpha_t = \gamma \cdot R / (1 + \gamma - R)} \quad \text{mit } R = \mu_1^t / \mu_1$$

Ein Übereinstimmen der nach (14a) und (14b) berechneten Werte für α_t würde das hier vorgeschlagene Modell stützen.

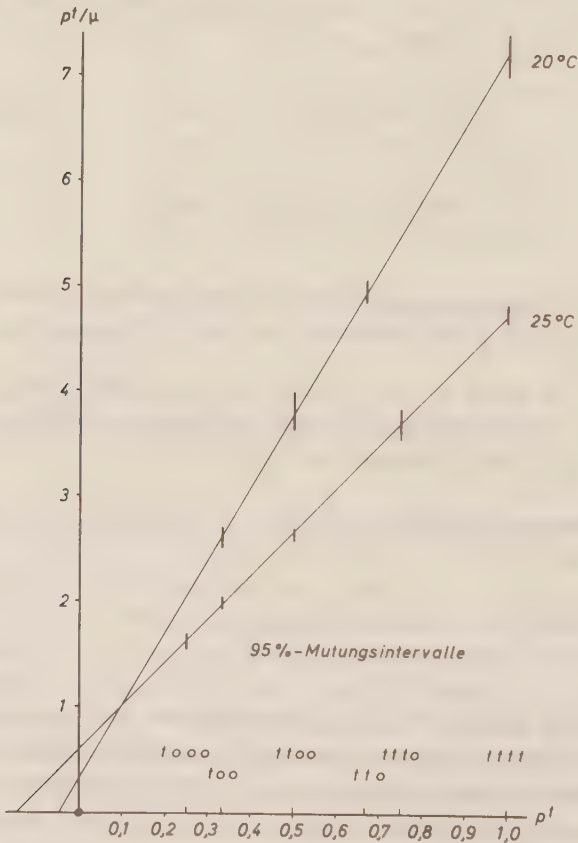


Abb. 20: Die Ergebnisse des [to] -Systems im $p^t/\mu - p^t$ -Diagramm.

Die in Abb. 20 im $p^t/\mu - p^t$ -Diagramm dargestellten, für 20° und 25° C erhaltenen experimentellen Ergebnisse lassen sich gut durch eine Gerade verbinden und befinden sich somit im Einklang mit den Grundannahmen des Modells.

Für (γ/α_t) und μ_1^t wurden regressionsanalytisch folgende Werte erhalten:

Tabelle 14

T [°C]	(γ/α_t)	μ_1^t [h ⁻¹]
20	0,0473	0,1387
25	0,1462	0,2120

Mit Hilfe dieser und der in Tabelle 13 wiedergegebenen Daten für das $\square + o \square$ -System errechneten sich nach den Gleichungen (14a) und (14b) die in Tabelle 15 [S. 78] zusammengestellten α_t -Beträge für verschiedene Temperaturen. Wegen der auf S. 52 [Fußnote 32] gemachten Einschränkung sind die für 35° C resultierenden α_t -Werte als Höchstwerte zu betrachten.

Wie aus Tabelle 15 zu ersehen ist, differieren die bei 20° und 25° C mit γ^{**} [= $0,24 \cdot \mu_1$] aus R und (γ/α_t) erhaltenen α_t -Werte weniger als die mit γ^* [Tabelle 13, 2. Spalte] ermittelten. Daraus kann eine indirekte Bestätigung für die Annahme gleichen Temperaturverhaltens von γ und μ_1 gezogen werden.

Andererseits zeigt die relativ gute Übereinstimmung der auf verschiedenem Wege kalkulierten α_t -Beträge, daß das hier entwickelte Modell in seiner Gesamtheit in sich konsistent ist. Daraus wurde die Berechtigung entnommen, die in der Abb. 13 [S. 54] gestrichelt gezeichneten $\square$ to $\square$ -Gendosiskurven für die Temperaturen von 28° und 35° C aus der alleinigen Kenntnis der Wachstumsgeschwindigkeiten der [tttt]- und Wildtyp-Homozygoten und des Zusammenhanges $\gamma = 0,24 \cdot \mu_1$ abzuschätzen.

Tabelle 15

$T [^{\circ}\text{C}]$	$\mu_1^t [\text{h}^{-1}]$	$\mu_1 [\text{h}^{-1}]$	$R [\%]$	γ^*	γ^{**}	(γ/α_t)	R u. γ^*		$\alpha_t [\%]$ mit $(\gamma/\alpha_t) \text{ u. } \gamma^*$		$(\gamma/\alpha_t) \text{ u. } \gamma^{**}$
20	0,1387	0,1409	98,4	0,0435	0,034	0,0473	72,4	67,5	92,0	71,9	
25	0,2120	0,2297	92,3	0,0536	0,055	0,1462	37,9	38,5	36,7	37,6	
28	0,122	0,3034	40,2	0,0833	0,073	***	4,9	4,4	***	***	
35	0,030	0,3926	7,6	0,0866	0,094	***	0,66	0,71	***	***	

γ^* ist der für jede Temperatur mit Hilfe der Regressionsanalyse bestimmte Wert (s. S. 73)

γ^{**} wurde gemäß $0,24 \cdot \mu_1$ berechnet (s. S. 75)

*** Für γ/α_t resultiert bei 28°C ein Wert von $\approx 1,7$, bei 35°C ein Wert von ≈ 13 . Mit diesen beiden Werten wurden die in Abb. 13 (S. 54) gestrichelt eingezeichneten Gendosiskurven errechnet.

In der Tabelle 16 seien noch einmal die mit R bzw. (γ/α_t) und γ^{**} bestimmten α_t -Beträge und die relativen, auf die Wildtypomozygoten bezogenen Wachstumsgeschwindigkeiten R der [tttt]-Tetraplonten in Abhängigkeit von der Temperatur zusammengetragen:

Tabelle 16

T [°C]	20	25	28	35
R [%]	98	92	40	7,6
α_t [%]	70 ⁴⁹	38 ⁴⁹	4,4	0,7

Nach unserem Modell beträgt die Aktivität des von der temperatursensiblen Mutante $[ad_{2-1}^t]$ codierten Enzyms an deren Temperaturoptimum nur etwa 38 % des Wildtypenzyms. Die daraus resultierende Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit auf 92 % des Wildtypniveaus entspricht einer Gendosis von $p^+ = 0,38 [\approx +00]$ im $\square + o \square$ -System.

Für das $\square + t \square$ -System würde sich Gl. (9) mit α_t und $p^+ = (1 - p^+)$ zu

$$(15) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot [p^+ + \alpha_t(1-p^+)]}{\gamma + [p^+ + \alpha_t(1-p^+)]}$$

vereinfachen. Eine kurze Überschlagsrechnung für $p^+ = 0,25 [+ttt]$ bei 35° C zeigt jedoch, daß die Gendosisabhängigkeit dieses Systems nicht mit Gl. (9) bzw. (15) zu beschreiben ist:

$$\mu_1 = 0,3926 \text{ h}^{-1}, \quad \gamma = 0,24 \cdot \mu_1 \approx 0,94, \quad \alpha_t \approx 0,007$$

$$[p^+ + \alpha_t(1-p^+)] = 0,25 + 0,007 \cdot 0,75 \approx 0,255$$

$$\mu = 1,094 \cdot 0,3926 \cdot 0,255 / 0,349 \approx 0,314 \text{ h}^{-1}$$

Gemessen wurde jedoch $[0,364 \pm 0,018] \text{ h}^{-1}$, s. Tabelle 10, S. 51

49) Mittelwert aus den nach (14a) und (14b) berechneten Werten.

Desgleichen ist unser Modell in seiner bisherigen Form für die Interpretation der Ergebnisse des $\square$ t s $\square$ - S y s t e m s unbrauchbar, da es z.B. nicht die Möglichkeit bietet, die durchhängende 28^0 -Kurve [s. Abb. 14, S. 55] zu simulieren.

Eine Ausweitung des Modells auf die beiden zuletzt besprochenen Systeme sei im folgenden Kapitel diskutiert, vorerst seien jedoch die bisherigen Befunde zusammengefaßt:

1. Der in Gl. (9) wiedergegebene formale Zusammenhang zwischen Gendosis und Wachstumsgeschwindigkeit ist geeignet, die im $\square$ +o $\square$ - und $\square$ to $\square$ -System auftretenden Gendosiswirkungen quantitativ zu beschreiben.
2. Das vom ad_2 -Locus codierte Enzym verhält sich in diesen beiden Systemen demnach so, als wäre es als M o n o m e r katalytisch aktiv.
3. Das hier vorgeschlagene Modell gestattet unter der Voraussetzung monomer aktiver Enzyme die Berechnung relativer allelspezifischer Enzymaktivitäten aus in vivo-Untersuchungen.
4. Der geringe Betrag der Konstanten γ belegt, daß die Zelle über einen relativ weiten Bereich Gendosisänderungen oder Aktivitätsschwankungen von Enzymen ohne gravierende Reduktion der Vermehrungsgeschwindigkeit abpuffern vermag.

5.4. Eine Erweiterung des Modells auf multimer aktive Enzyme

Im vorigen Kapitel wurde festgestellt, daß sich das vom ad_2 -Locus codierte Polypeptid im $[+o]$ - und $[to]$ -System wie ein monomer aktives Enzym verhält. Sowohl die Ergebnisse des $[+t]$ - und $[ts]$ -Systems als auch die Existenz komplementierender ad_2 -Mutanten [SOIDLA 1965, WOODS u. BEVAN 1966, SOIDLA u. INGE-VECHTO-MOV 1966, NASHED et al. 1967] widersprechen jedoch diesem Befund.

Auf Vorstellungen von CATCHESIDE u. OVERTON 1955, FINCHAM 1959 und BRENNER 1959 [cf. die zusammenfassende Übersicht von FINCHAM 1966] zurückgehend, läßt sich die intragenische Komplementierung zweier Allele, die für sich allein zu inaktiven, gemeinsam in einer Zelle vorliegend jedoch zu aktiven Enzymen führen, in befriedigender Weise mit der "Hybridprotein-Hypothese" interpretieren. Danach ist das von dem komplementationsfähigen Locus codierte Enzym nur als *Multimer*⁵⁰ katalytisch aktiv. Während homozygot vorliegende Allele nur zu *Homomultimeren*⁵⁰ aggregierende Polypeptidketten liefern können, denen bei Mutationen zur entsprechenden Auxotrophie keine katalytische Aktivität zukommt, werden nach dieser Hypothese im heterozygoten Zustand mit gewissen Wahrscheinlichkeiten auch *Heteromultimeren*⁵⁰ gebildet, die im Fall der Komplementierung mutativ bedingte Faltungsaberrationen (o.ä.) mehr oder weniger gut kompensieren können.

Inzwischen konnte sowohl aus in vitro- als auch aus in vivo-Untersuchungen eine Reihe von Befunden zusammengetragen werden [s. z.B. SCHLESINGER u. LEVINTHAL 1965, FINCHAM 1966], die für die Richtigkeit der hier umrissenen Vorstellungen sprechen.

Bevor jedoch die Gendosiskurven unter diesem neuen Aspekt diskutiert werden, seien zunächst einige aus der Hybridprotein-Hypothese resultierende Konsequenzen an einem allgemeinen Beispiel diskutiert.

50) Die Bezeichnungen gehen auf CRICK u. ORGEL 1964 zurück.

Irgendein Strukturgen Z codiert im Wildtyp [Z^+] eine Polypeptidkette W, die erst nach Aggregation von vier W unter Bildung eines Tetramers [WWWW] katalytische Aktivität erlangt.

Stellt man nun ein Hybriden-Stammsystem aus den durch Punktmutation des Genes Z hervorgegangenen Allelen Z^a und Z^b [Genprodukte: A,B] her, so sollten in Abhängigkeit von den Gendosen des Z^a - bzw. Z^b -Allels [p^a bzw. $p^b = 1-p^a$] mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten Tetramere der Typen

AAAA [= A_4], AAAB [= A_3B], AABB [= A_2B_2], ABAB [= AB_3], BBBB [= B_4]

in den Zellen gebildet werden.

Nimmt man jetzt an, daß die Untereinheiten vollkommen stochastisch miteinander aggregieren, so dürfte die Verteilung der obigen fünf Tetramertypen dem Binomialsatz⁵¹ unterliegen.

Daraus resultieren folgende Vorkommenswahrscheinlichkeiten

$w(A_nB_{4-n})$:

$$\begin{aligned} w(A_4) &= \binom{4}{0} \cdot (p^a)^4 &= (p^a)^4 \\ w(A_3B) &= \binom{4}{1} \cdot (p^a)^3 \cdot (1-p^a) &= 4 \cdot (p^a)^3 \cdot (1-p^a) \\ w(A_2B_2) &= \binom{4}{2} \cdot (p^a)^2 \cdot (1-p^a)^2 &= 6 \cdot (p^a)^2 \cdot (1-p^a)^2 \\ w(AB_3) &= \binom{4}{3} \cdot (p^a) \cdot (1-p^a)^3 &= 4 \cdot (p^a) \cdot (1-p^a)^3 \\ w(B_4) &= \binom{4}{4} \cdot (1-p^a)^4 &= (1-p^a)^4 \end{aligned}$$

51) Diese Annahme wird z.B. durch die Befunde der in vitro-Komplementierungsstudien von SCHLESINGER u. LEVINTHAL 1963 über E. coli - Mutanten, deren Alkalische Phosphatase geschädigt ist, und durch den biochemischen Nachweis binomial verteilter Hybridmoleküle der β -Glucosidase in einer Bastardhefe [FLEMING u. DUEKSEN 1967] gestützt.

Ferner sollten sich den fünf Typen relativ zu WWW die spezifischen Aktivitäten $\alpha(A_n B_{4-n})$ zuordnen lassen⁵². Für die weiteren Betrachtungen sei jedoch stark vereinfachend angenommen, daß alle Heteromultimere die gleiche relative Aktivität α_{AB} besitzen, während den Homomultimeren die Aktivitäten α_A und α_B zukommen. Dann genügt es, folgende Vorkommenswahrscheinlichkeiten anzugeben:

$$\begin{aligned} w(A_4) &= (p^a)^4 \\ w(B_4) &= (1-p^a)^4 \\ w(\text{Heterotetramer}) &= 1 - (p^a)^4 - (1-p^a)^4 \end{aligned}$$

oder allgemein für Multimere vom Grad m :

$$\begin{aligned} w(A\text{-Homomultimer}) &= (p^a)^m \\ w(B\text{-Homomultimer}) &= (1-p^a)^m \\ w(\text{Heteromultimer}) &= 1 - (p^a)^m - (1-p^a)^m \end{aligned}$$

Unter diesem Aspekt kann der in Kapitel 5.3. abgeleitete formale Zusammenhang zwischen Gendosis und Wachstumsgeschwindigkeit auch auf multimer aktive Enzyme ausgedehnt werden. Er würde dann für ein Hybriden-Stammsystem mit den Allelen Z^a und Z^b eines Struktur-gens Z allgemein lauten:

$$(16) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot \left\{ \alpha_A \cdot (p^a)^m + \alpha_B \cdot (1-p^a)^m + \alpha_{AB} \cdot [1 - (p^a)^m - (1-p^a)^m] \right\}}{\gamma + \left\{ \alpha_A \cdot (p^a)^m + \alpha_B \cdot (1-p^a)^m + \alpha_{AB} \cdot [1 - (p^a)^m - (1-p^a)^m] \right\}}$$

=====

52) Es sei darauf hingewiesen, daß der Tetramertyp A_2B_2 bei Annahme einer gegenständigen Anordnung der vier Untereinheiten zwei strukturell verschiedene Konfigurationsmöglichkeiten enthält, denen möglicherweise differente Aktivitäten zukommen:



Würde nun Gl. (16) [oder eine noch komplexere Form mit unterschiedlichen Aktivitäten für die differenten Heteromultimere] die Gendosisabhängigkeiten des $\square + o \square$ - bzw. $\square to \square$ -Systems beschreiben, sollten im $p/\mu - p$ -Diagramm [s. Abb. 19 A, 20] Abweichungen vom geradlinigen Verlauf zu erwarten sein. Da das offensichtlich nicht der Fall ist, kann die Voraussetzung einer *stochastischen Hybridprotein-Bildung* für diese beiden Systeme mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zutreffen. Vielmehr darf daraus mit einiger Berechtigung gefolgert werden, daß das ad_{2-2}^o -Allel aggregationsunfähige Peptidfragmente oder zwar vollständige, jedoch an einem entscheidenden Aggregations-Site veränderte Polypeptidketten codiert. Unter diesen Bedingungen würden sich in den beiden Systemen ausschließlich *Homomultimere* aus den Genprodukten der ad_{2-}^+ bzw. ad_{2-1}^t -Allele bilden, so daß die Gendosiskurven ein *monomeres aktives Enzym vortäuschen*.

Andererseits enthalten die letzten Überlegungen eine einleuchtende Interpretation für das Verhalten des $\square + t \square$ -Systems bei Temperaturen über $30^{\circ}C$: Im Gegensatz zu den $\square + o \square$ - und $\square to \square$ -Hybriden sollten die $\square + t \square$ -Heterozygoten in der Lage sein, enzymatisch aktive Heteromultimere aufzubauen, wodurch der durch die Mutation zum ad_{2-1}^t -Zustand gesetzte Schaden weitgehend kompensiert werden könnte.

Anhand der 35° -Kurve des $\square + t \square$ -Systems sei mit Hilfe von Gl. (16) eine vorsichtige Abschätzung des Multimerisationsgrades m des vom ad_2 -Locus codierten Enzyms vorgenommen:

Mit der stark vereinfachenden, im Ergebnis zu Minimalwerten für m führenden Annahme, daß die Heteromultimere die gleiche katalytische Aktivität wie die Wildtyp-Homomultimere besitzen [$\alpha_A = \alpha_+ = 1$, $\alpha_{AB} = 1$] und unter Vernachlässigung von $\alpha_B = \alpha_t = 0,007$ erhält man aus (16) mit $p^a = p^+$

$$(17) \quad \mu = \frac{(1+\gamma) \cdot \mu_1 \cdot [1 - (1-p^+)^m]}{\gamma + [1 - (1-p^+)^m]}.$$

Ferner sei angenommen, daß die gemessene Wachstumsgeschwindigkeit μ für $p^+ = 0,33$ [+tt] von 97 % des Wildtypniveaus [0,380 statt 0,392 h^{-1} , s. Tabelle 10, S. 51] signifikant sei.

Dann würde diese Wachstumsgeschwindigkeit einer Gendosis $p^+ = 0,73$ im $\square +o \square$ -System entsprechen:

$$0,73 = 1 - (1-0,33)^m.$$

Daraus folgt ein Multimerisationsgrad von $m \approx 3,3$.

Führt man diese grobe und mit aller Vorsicht zu betrachtende Abschätzung auch für weitere Punkte des $\square +t \square$ -Systems durch, erhält man regelmäßig Werte von $m > 2$. Man darf daher vermuten, daß das vom ad_2 -Locus codierte Polypeptid nicht als Dimer enzymatisch aktiv ist, sondern einen (möglicherweise weit) höheren Multimerisationsgrad aufweist.

Analog zu den Befunden von INGE-VECHTOMOV et al. (1966), die durch Einkreuzen eines Super-Suppressors in einen nicht komplementierenden *Saccharomyces*-Diplonten aus einem supprimierbaren und einem nicht supprimierbaren mutierten ad_2 -Allel interallelische Komplementierung induzierten, lassen sich die Ergebnisse des $\square ts \square$ -Systems im Rahmen der hier umrissenen Vorstellungen deuten, wenn man fordert, daß die Genprodukte der t- und supprimierten t-Allele miteinander (in Abhängigkeit von der Temperatur mehr oder weniger aktive) Heteromultimere bilden können. Da jedoch über den Wirkungsgrad des isolierten Suppressors [Einbauwahrscheinlichkeit für die suppressorspezifische Aminosäure] nichts bekannt ist, muß auf eine quantitative Auswertung dieses Systems gemäß Gl. (16) verzichtet werden. Es sei nur festgestellt, daß sich die Vorkommenswahrscheinlichkeit supprimierter Homomultimere mit abnehmender Gendosis p^s sukzessive verringern dürfte, wobei diese Verringerung umso stärker erfolgen sollte, je größer der Multimerisationsgrad m des vom ad_2 -Locus codierten Enzyms ist.

Aus dem mit zunehmender Suppressordosis p^s abfallenden Verlauf der $\mu - p^s$ -Kurve bei 25° C kann geschlossen werden, daß die supprimier-

ten [S-] Homomultimere bei dieser Temperatur eine bedeutend geringere katalytische Aktivität als die Heteromultimere und die Homomultimere aus dem Genprodukt des t-Allels [kurz: T-Homomultimere] besitzen.

Mit steigender Temperatur dürften die S-Homomultimere stark an Aktivität gewinnen, während die Aktivität der Heteromultimere noch tiefer als die der T-Homomultimere absinkt. Auf diese Weise könnte die durchhängende Gendosiskurve bei 28° C zustande kommen. Mit einer weiteren Erhöhung der Temperatur dürfte zwar die Aktivität der S-Homomultimere wieder abfallen, sie dürfte jedoch ausreichen, um zumindest in den [tttt ssss] - bzw. [ttt sss]- Stämmen eine bezüglich der [tttt ----]-Homozygoten erheblich erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit zu bewirken, während sich in den Heterozygoten eine beträchtliche Aktivitätsminderung der Hetero- und T-Homomultimere bemerkbar macht.

Abschließend sei festgestellt, daß sich die gefundenen Gendosisabhängigkeiten aller vier verwendeten Stammsysteme mit dem hier vorgeschlagenen Modell, das auf den heutigen Vorstellungen über die Wirkungsweise von Genen fußt, ausnahmslos interpretieren lassen. Das beweist jedoch nicht, daß dieses Modell mit all seinen Voraussetzungen der Wirklichkeit entspricht [so nehmen z.B. NASHED et al. 1967 zur Deutung ihrer Untersuchungen über negativ komplementierende ad₂-Mutanten von *Saccharomyces u.a.* eine nicht-stochastische Multimer-Bildung an]. Zu seiner Überprüfung sind Isolierung und biochemische Analysen des vom ad₂-Locus codierten Enzyms aus den vier Hybriden-Systemen geplant. Die Bestätigung seiner Richtigkeit würde eine wertvolle Methode zur Verfügung stellen, die Aussagen über Aufbau und Aktivitäten von Enzymen, die noch nicht isoliert wurden, aus derartigen in vivo-Untersuchungen gestattet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hefe *Saccharomyces* ist zur Herstellung weitestgehend isogener polyploider Stammserien besonders geeignet. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte Auswirkungen von Genmutationen in diskreten Abstufungen [Gendosiswirkungen] zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden folgende tri- und tetraploiden Stammsysteme mit definierten Änderungen im ad_2 -Locus und einheitlichem genetischen Hintergrund aufgebaut und deren Wachstumsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Temperaturen auf festem Minimalmedium bestimmt:

1. $\square + o \square$ -System, mit unterschiedlichen Anteilen von ad_2^+ [$+$ = Wildtyp] und ad_{2-2}^o -Allelen [o = temperaturunabhängig Adenin-bedürftig]. Ein schrittweiser Ersatz der $+$ -Allele der homozygoten Tri- und Tetraplonten durch o -Allele führt zu einem verstärkten Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit, wobei der Verlauf der Gendosiskurven [Abszisse: Gendosis $p^+ = +$ -Allele/Ploidiegrad; Ordinate: Wachstumsgeschwindigkeit μ] an die LANGMUIRsche Adsorptionsisotherme erinnert. Dieser Verlauf wird durch einen formalen Zusammenhang, der aus einer von MONOD 1942 für die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Konzentration eines wachstumsbegrenzenden Nährstoffes im Medium aufgestellten Beziehung abgeleitet wurde, signifikant beschrieben.
2. $\square + t \square$ -System, mit unterschiedlichen Anteilen von ad_2^+ und ad_{2-1}^t -Allelen [t = temperaturabhängig Adenin-bedürftig, Vermehrung der [tttt]-Homozygoten bei 25° C etwa 92 % des Wildtypniveaus, bei 35° C praktisch wie bei der o -Mutante]. Die Gendosiskurven dieses Systems verlaufen bei 35° und 40° C jedoch nicht - wie erwartet - auf denen des $\square + o \square$ -Systems, sondern bedcutend darüber, so daß selbst bei $p^+ = 0,25$ [$+ttt$] kein signifikanter Unterschied zu den homozygoten Wildtyptri- und -tetraplonten besteht.
3. $\square to \square$ -System, mit unterschiedlichen Anteilen von ad_{2-1}^t und ad_{2-2}^o -Allelen, verhält sich bei 25° C analog dem $\square + o \square$ -System. Die Gendosiswirkungen [Gendosis: p^t] sind stärker ausgeprägt, da die [tttt]-Homozygoten nur etwa 92 % des Wildtypwachstums errei-

chen. Der Kurvenverlauf gehorcht dem oben erwähnten formalen Zusammenhang. Es lassen sich auf den Wildtyp bezogene, relative allelspezifische Enzymaktivitäten berechnen.

4. ts -System, entstand durch Einkreuzen eines spontan mutierten Suppressorgens für das temperatursensible Allel [$su_1^+ - ad_2^t$, kurz s, das entsprechende Wildtypallel wird mit - bezeichnet] in t-homozygote Tri- und Tetraplonten. Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Gendosis p^s [Anteil der Suppressorallele s pro Ploidiegrad bei steter Homozygotie der t-Allele] läßt sich für 25°, 28° und 35° C wie folgt charakterisieren:

25° C: tttt---- > ttttss-- > ttttssss

28° C: ttttssss > tttt---- > ttttss--

35° C: ttttssss > ttttss-- > tttt----

Durch Vergleich der Gendosiskurven der vier Stammsysteme wird folgendes Modell zur Interpretation der Gendosiskurven vorgeschlagen:

1. Das vom ad_2 -Locus codierte Polypeptid ist nicht als Monomer, sondern nur als Multimer enzymatisch aktiv. Einen Hinweis hierfür bietet bereits das Auftreten komplementierender ad_2 -Mutanten.
2. Das o-Allel bildet entweder nur Peptidfragmente [Unsinn-Mutation] oder vollständige Polypeptidketten, bei denen eine Aminosäure an einem entscheidenden Aggregationspunkt ausgetauscht wurde [Fehlsinn-Mutation], so daß Hybridisierungen der o- mit den +- oder t-Genprodukten verhindert und ausschließlich Homomultimere der +- oder t-Genprodukte gebildet werden. Daher ist der erwähnte, eigentlich für monomer aktive Genprodukte abgeleitete formale Zusammenhang auch auf das $[+o]$ - bzw. $[to]$ -System anwendbar.
3. Die Genprodukte des t-Allels dagegen können mit denen des +-Allels hybridisieren und enzymatisch aktive Heteromultimere bilden, so daß sich über einen relativ weiten Gendosisbereich im $[+t]$ - System Gendefekte nicht bemerkbar machen.
4. Die homomultimeren Genprodukte der t- und supprimierten t-Allele sowie die Heteromultimeren aus beiden Typen zeigen unterschied-

liche Temperaturabhängigkeit, wobei wegen des Mechanismus der Suppressorwirkung zu beachten ist, daß auch im s-homozygoten Zustand mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten Homo- und Heteromultimere aus beiden Typen gebildet werden können. Die aus dem Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten resultierende Gesamtenzymaktivität bei einer bestimmten Temperatur spiegelt sich in den Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Stämme wieder.

Ausbau und Untermauerung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Vorstellungen könnten zu einer allgemeinen Methode führen, die Aussagen über Aufbau und Aktivität von Enzymen, die noch nicht isoliert wurden, aus derartigen in vivo-Untersuchungen gestattet.

7 . L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ADELBERG, E.A., M. MANDEL u. G. CHEIN CHING CHEN (1965): Biochem. Biophys.Res.Comm. 18, 788
- BARBEN, H. (1966): Genetica 37, 109
- BENZER, S. u. S.P. CHAMPE (1962): Proc.Natl.Acad.Sci. 48, 1114
- BRENNER, S. (1959): CIBA Foundation Symposium on the Biochemistry of Human Genetics, Churchill, London, 304
- BRENNER, S., A.O.W. STRETTON u. S. KAPLAN (1965): Nature 206, 994
- BRESCH, C. (1964): "Klassische und Molekulare Genetik", Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg
- BRETSCHER, M.S., H.M. GOODMAN, J.R. MENNINGER u. J.D. SMITH (1965): J.Mol.Biol. 14, 634
- BRODY, S. u. C. YANOFSKY (1963): Proc.Natl.Acad.Sci. 50, 9
- CAPECCHI, M.R. (1967): Proc.Natl.Acad.Sci. 58, 1144
- CATCHESIDE, D.G. u. A. OVERTON (1965): Cold Spring Harbour Symp. Quant.Biol. 23, 137
- CHANDRA, P., A. WACKER, R. SÜSSMUTH u. F. LINGENS (1967): Z.Naturforschg. 22b, 512
- CRICK, F.H.C. u. L.E. ORGEL (1964): J.Mol.Biol. 8, 161
- CUTTS, N.S. u. C. RAINBOW (1950): Nature 166, 1117
- DIFCO-Manual (1953): Difco Laboratories, Detroit, Mich.
- DIXON, M. u. E.C. WEBB (1966): "Enzymes", Longmans, London, 2.Aufl.
- EMEIS, C.C. (1958): Naturwiss. 45, 441
- EMEIS, C.C. u. H. GUTZ (1958): Z.Naturforschg. 13b, 647
- EMEIS, C.C. u. S. WINDISCH (1960): Z.Naturforschg. 15b, 702
- EMEIS, C.C. u. S. WINDISCH (1960*): Naturwiss. 47, 210
- EPHRUSSI, B. u. E. LEDERER (1948): Experientia 4, 433
- ESSER, K. u. R. KUENEN (1965): "Genetik der Pilze", Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg

- FENCL, Z. (1966): "Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems" in "Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms", herausgegeben von I. MALEC u. Z. FENCL, Academic Press, New York-London
- FINCHAM, J.R.S. (1959): J.Gen.Microbiol. 21, 600
- FINCHAM, J.R.S. (1966): "Genetic Complementation", W.A. Benjamin, Inc., New York-Amsterdam
- FLEMING, L.W. u. J.D. DUERKSEN (1967): J.Bact. 93, 142
- FRIEDMAN, H. u. A.G. MOAT (1958): Arch.Biochem.Biophys. 78, 146
- GALUCCI, E. u. A. GAREN (1966): J.Mol.Biol. 15, 193
- GAREN, A., S. GAREN u. R.C. WILHELM (1965): J.Mol.Biol. 14, 167
- GILMORE, R.A. (1966): "Super-suppressors in *Saccharomyces cerevisiae*", Ph.D. Thesis, University California, Berkeley, Lawrence Radiation Laboratory, Report 16851 (unveröffentlicht)
- GILMORE, R.A. (1967): Genetics 56, 641
- GILMORE, R.A. u. R.K. MORTIMER (1966): J.Mol.Biol. 20, 307
- GOLDSCHMIDT, R.B. (1955): "Theoretical Genetics", University of California Press, Berkeley-Los Angeles. Deutsche, von F. u. H. SCHWANITZ übersetzte Auflage (1961): "Theoretische Genetik", Akademie-Verl., Berlin
- GORINI, L. u. J.R. BECKWITH (1966): Ann.Rev.Microbiol. 20, 401
- HARBERS, E. (1964): "Die Nucleinsäuren", Georg Thieme, Stuttgart
- HAWKERS, L.E., A.H. LINTON, B.F. FOLKES u. M.J. CARLILE (1962): "Einführung in die Biologie der Mikroorganismen", Georg Thieme, Stuttgart
- HAWTHORNE, D.C. u. J. FRIIS (1964): Genetics 50, 829
- HAWTHORNE, D.C. u. R.K. MORTIMER (1963): Genetics 48, 617
- HELINSKI, D.R. u. C. YANOFSKY (1963): J.Biol.Chem. 238, 1043

- HENNING, U. u. C. YANOFSKY (1962): Proc.Natl.Acad.Sci. 48, 1497
- HOWARTH, S. (1958): Genetics 43, 404
- INGE-VECHTOMOV, S.G., T.R. SOIDLA, S.A. KOZIN u. B.V. SIMAROV
(1966): Z.Vererbungsbl. 98, 375
- ITOH, M. u. Y. NOSOH (1965): Plant and Cell Physiol. 6, 779
- JACOB, F. u. J. MONOD (1961): J.Mol.Biol. 3, 318
- JANNSEN, S. u. W. LASKOWSKI (1967): Biophysik 4, 97
- KAKAR, S.N. (1963): Genetics 48, 967
- KAPLAN, S., A.O.W. STRETTON u. S. BRENNER (1965): J.Mol.Biol. 14, 528
- LASKOWSKI, W. (1960): Z.Naturforschg. 15b, 495
- LASKOWSKI, W. (1960*): "Entwicklungscyclen und Erbverhalten der
Hefen" in "Die Hefen", Bd. 1, Verlag Hans Carl,
Nürnberg
- LASKOWSKI, W. (1962): Z.Naturforschg. 17b, 93
- LEIN, J. u. P.S. LEIN (1952): Proc.Natl.Acad.Sci. 38, 44
- LENGYEL, P. (1967): "On Peptide Chain Initiation" in "Molecular
Genetics", Part II, herausgegeben von J.H.
TAYLOR, Academic Press, New York-London
- LEUPOLD, U. (1956): C.r.Trav.Lab.Carlsberg, Sér.Physiol. 26, 221
- LEVINTHAL, M., S. FOGEL u. D. HURST (1962): Genetics 47, 967
- LINDEGREN, C.C. u. G. LINDEGREN (1951): J.Gen.Microbiol. 5, 885
- LINGENS, F. u. O. OLTMANNS (1966): Z.Naturforschg. 21b, 660
- MAGNI, G.E., R.C. von BORSTEL u. C.M. STEINBERG (1966): J.Mol.
Biol. 16, 568
- MANNEY, T.R. (1964): Genetics 50, 109
- MATTHAEI, H., G. SANDER, D. SWAN, T. KREUZER, H. CHAFFIER u. A. PAR-
MEGGIANI (1968): Naturwiss. 55, 281
- MAZLEN, A.S. u. N.R. EATON (1967): Biochem.Biophys.Res.Comm. 26,

- McCLARY, D.O., W.L. NULTY u. G.R. MILLER (1959): J.Bact. 78, 362
- MEGNET, R. (1965): Mutation Res. 2, 328
- MONOD, J. (1942): "Recherches sur la Croissance des Cultures Bactérienne", Herman et Cie., Paris
- MORTIMER, R.K. (1958): Rad. Res. 9, 312
- MORTIMER, R.K. u. D.C. HAWTHORNE (1966): Genetics 53, 165
- MÜLLER, I. (1965): Z.Vererbungsl. 97, 111
- NASHED, N., G. JABBUR u. F.K. ZIMMERMANN (1967): Molec.Gen.Genetics 99, 69
- POHLIT, W., W. LASKOWSKI u. E.-R. LOCHMANN (1966): Z.Naturforsch. 21b, 1089
- ROMAN, H. u. S.M. SANDS (1953): Proc.Natl.Acad.Sci. 39, 171
- ROMAN, H., M.M. PHILLIPS u. S.M. SANDS (1956): Genetics 40, 546
- SAMBROOK, J.F., D.P. FAN u. S. BRENNER (1967): Nature 214, 452
- SARABHAI, A.S., A.O.W. STRETTON, S. BRENNER u. A. BOLL (1964): Nature 201, 13
- SCHLESINGER, M. u. C. LEVINthal (1963): J.Mol.Biol. 7, 1
- SCHLESINGER, M. u. C. LEVINthal (1965): Ann.Rev.Microbiol. 19, 267
- SMIRNOV, M.N., V.N. SMIRNOV u. S.G. INGE-VECHTOMOV (1966): IX. Int. Congr.Microbiol., Moskau, Tezisi dokladov, p 222
- SMIRNOV, M.N., V.N. SMIRNOV, E.J. BUDOWSKY, S.G. INGE-VECHTOMOV u. N.G. SEREBRJAkov (1967): Biochem.Biophys.Res. Commun. 27, 299
- SÖLL, D. (1968): J.Mol.Biol. 34, 175
- SOIDLA, T. (1965): Genetica N 3, 127
- SOIDLA, T. u. S.G. INGE-VECHTOMOV (1966): Genetika 9, 141
- SÜSSMUTH, R. u. F. LINGENS (1968): Naturwiss. 2, 85

- SPEYER, J.F. (1967): "The Genetic Code" in "Molecular Genetics",
Part II, herausgegeben von J.H. TAYLOR,
Academic Press, New York-London
- STERN, C. (1929): Biol.Zbl. 49, 261
- STRETTON, A.O.W. u. S. BRENNER (1965): J.Mol.Biol. 12, 456
- STURTEVANT, A.H. (1925): Genetics 10, 117
- TAVALITZKI, J. (1951): Rev.can.biol. 10, 48
- TAYLOR, J.H. (1963): [Herausgeber] "Molecular Genetics", Part I,
Academic Press, New York-London
- TAYLOR, J.H. (1967): [Herausgeber] "Molecular Genetics", Part II,
Academic Press, New York-London
- WATSON, J.D. (1965): "Molecular Biology of the Gene", W.A. Benjamin,
Inc., New York
- WEIGERT, M.G., E. LANKA u. A. GAREN (1965): J.Mol.Biol. 14, 522
- WEIGERT, M.G. u. A. GAREN (1965): J.Mol.Biol. 12, 448
- WEIGERT, M.G. u. A. GAREN (1965*): Nature 206, 992
- WOODS, R.A. u. E.A. BEVAN (1966): Heredity 21, 121
- YANOFSKY, C. u. St.LAWRENCE (1960): Ann.Rev.Microbiol. 14, 311
- ZACHAU, H., D. DÜTTING u. M. FELDMAN (1966): Angew.Chem. 78, 392

LEBENS LAUF

Am 19.2.1940 wurde ich, Uwe Dietmar Reichert, als Sohn des Polizeibeamten Gerhard Reichert und seiner Ehefrau Margarete (geb. Krause) in Oppeln/Oberschlesien geboren.

Die ersten drei Grundschuljahre [Einschulung Ostern 1947] verbrachte ich in Lingen/Ems, das vierte in Osnabrück. Von Ostern 1951 an besuchte ich das Osnabrücker Ratsgymnasium, das ich im Februar 1960 mit dem Reifezeugnis verließ, um im Sommersemester 1960 das Studium der Biologie an der Universität Münster zu beginnen.

Zum Sommersemester 1962 wurde ich an der Freien Universität Berlin für die Fachrichtung Zoologie immatrikuliert. Hier legte ich im Wintersemester 1964/65 die Diplom-Vorprüfung ab. Zum Sommersemester 1968 wurde ich exmatrikuliert.

Am 1.12.1967 schloß ich die Ehe mit Petra Hardtke.

Seit Mai 1965 bin ich am Institut für Biophysik der Freien Universität [vom 1.5.65 zum 31.12.67 als Wissenschaftlicher Hilfsassistent, seit dem 1.1.68 als Wissenschaftlicher Mitarbeiter] beschäftigt.

Das Thema der vorliegenden Arbeit erhielt ich im Sommer 1965 von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski.

